

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular



Funciones de Calcineurina y Rcan1 en el remodelado patológico de la pared vascular

Nerea Méndez Barbero

Madrid, 2014

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular



Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares



Funciones de Calcineurina y Rcan1 en el remodelado patológico de la pared vascular

Memoria presentada para la obtención del título de doctor por:

Nerea Méndez Barbero

Directores de tesis:

Dr. Juan Miguel Redondo Moya

Dr. Miguel Campanero García

Los Doctores Juan Miguel Redondo Moya, Investigador Senior en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, y Miguel R. Campanero García, Científico Titular del CSIC

CERTIFICAN

Que Dña. Nerea Méndez Barbero, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid y Máster en Biomedicina Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título: Funciones de calcineurina y Rcan1 en remodelado patológico de la pared vascular.

Revisado el presente trabajo, expresamos nuestra conformidad para la presentación del mismo en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a su evaluación ante el tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctora en Biociencias Moleculares.

En Madrid, a 29 de Mayo de 2014

Dr. Juan Miguel Redondo Moya
Investigador Senior CNIC

Dr. Miguel Campanero García
Científico Titular CSIC

Esta tesis ha sido realizada en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares bajo la dirección del Dr. Juan Miguel Redondo Moya y el Dr. Miguel Campanero García. Nerea Méndez Barbero ha disfrutado de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU2008-1500).

A mi abuela Julia.

*"Los fracasos son también útiles, porque,
bien analizados, pueden conducir al éxito".*

Alexander Fleming

*".....Un día supe que buscar
era lo que me mantenía despierto.
Sin recompensa cierta.
Haciéndome preguntas
al barrer mis espolones el polvo....."*

Manolo García, compositor

A microscopic image of a tissue section, likely stained with hematoxylin and eosin (H&E). The image shows a complex arrangement of cells and fibers, with a prominent area of dense, dark-staining material in the lower right corner, possibly representing a tumor or a highly cellular region. The overall texture is granular and fibrous, with various shades of pink, purple, and blue.

AGRADECIMIENTOS

Me pongo a escribir estas líneas y todavía no puedo creer que hayan pasado 5 años desde el primer día que entre en el CNIC. Siempre me ha gustado la Biología y desde que era una enana tenía claro que quería ser investigadora, aunque no creo que supiera muy bien lo que eso significaba. Recuerdo cuando entre por primera vez por la puerta del CNIC a hacer la entrevista en el laboratorio de Dr. Redondo, pensé en lo alucinante que era aquel sitio y en la cantidad de oportunidades científicas que parecía brindar. Cuando a los días recibí la llamada de que era la seleccionada no podía creerlo y pensé que el primer paso en ciencia había llegado. Desde entonces ha pasado mucho tiempo, muchas personas, muchas sensaciones, muchos experimentos, muchas vivencias, que han ido formando lo que en realidad soy en este momento. No me resulta nada fácil poder agradecer con un papel y un bolígrafo lo que en realidad me gustaría transmitir a cada uno de los que habéis formado parte de este todo, pero como en el mejor y más planeado de los experimentos intentaré optimizar todos los parámetros para que el resultado sea el esperado.

No podría empezar sin dar las gracias a la persona que ha hecho posible esta historia, al Dr. Juan Miguel Redondo "**Juanmi**". Gracias por darme la oportunidad de demostrar mis ganas de hacer ciencia, por tu cercanía que hace más fácil el trabajo diario, por enseñarme a ser más optimista y creer en mí en todos los pasos que he ido dando, y por educarme en el camino de la buena ciencia.

A mi codirector de tesis el Dr. Miguel Campanero, para mí "**Campi**", por su paciencia y sus esfuerzos de estar siempre ayudándome aunque por logística fuera más difícil. Por enseñarme a ser meticulosa, y por valorar siempre mis pensamientos científicos y compartir conmigo discusiones sobre nuestras hipótesis y resultados.

A mi amiga y maestra la Dr. Vanesa Esteban "**Van**", porque es la otra mitad de toda esta historia, y porque sin ella no sería lo que ahora soy tanto profesional como personalmente. Mil gracias por todas tus enseñanzas, por los ratos de curro aplastador tanto en el animalario como en el bench que tanto hemos disfrutado. Gracias por acogerme desde el primer momento y enseñarme todo. Gracias por todos los momentos personales, por tu apoyo siempre incondicional incluso ahora que estas lejos. En definitiva gracias por ser cómo eres.

A **Sara** por enseñarme la perseverancia en ciencia, por ser meticulosa y siempre dando buenos consejos de cómo hacer los experimentos, y por compartir conmigo los cambios climáticos tan bruscos en nuestro rincón.

A **Loli** porque me ha enseñado el valor de la organización y el trabajo en equipo. Porque a pesar de sus regañinas a veces, contribuye a que nuestro trabajo sea más organizado respetando el trabajo y espacio de los demás. Gracias también por los ratos de charlas sobre montaña, trekking y demás deportes que compartimos.

A **Pablo** porque día a día me transmite su fuerza y ganas de hacer ciencia aunque los tiempos sean difíciles, porque es un magnifico científico y porque siempre te da su consejo.

A **Silvia** porque me ha apoyado en los últimos momentos difíciles en los que he estado y por hacerme descubrir lo bonito que es enseñar. Gracias por tu serenidad y profesionalidad espero que todo lo que te he transmitido sirva para que te ilusiones y disfrutes día a día de la ciencia.

A **Ruth**, por su forma de ser y por hacerme reír, porque aun siendo la más pequeña de edad me ha demostrado su grandeza personal. Porque espero que aunque en algunos momentos tanto

trabajo haya sido agotador, todo lo que hemos aprendido te sirva para acordarte de mí siempre que veas una aorta.

A **Bea** por ser tan amable y por todos los ratos de risas que hemos compartido. Por ser tan "mary" y hacernos ver la vida desde otro punto de vista. "Con permiso" sigue así que eres genuina.

A **Noe** por compartir conmigo buenos ratos de risas y de viajes. Porque siempre me ha sorprendido por su sabiduría en cualquier tema de la vida y por los ratos de sobremesas tan intensos que hemos pasado.

A **Jorge** que me ha hecho descubrir la paciencia que no sabía que tenía. Me alegra saber que has aprendido bastantes cosas trabajando a mi lado.

A la gente con la que he coincidido en el labo de Juami en algún momento de todo este tiempo; A **Arantza** por su paciencia y sabiduría, porque siempre ha estado disponible para explicarme de la mejor de las maneras cualquier cosa que le preguntara. A **Isa** por su sonrisa continua. A **Felipe** por sus conversaciones en cultivos por enseñarme a ver las cosas desde otro punto de vista y sobre todo por su humildad. A **Antonio Rodríguez** porque aunque no hayamos compartido mucho tiempo le valoro como un gran científico. A **Eva Cano** que siempre me ha dado su apoyo. A **Raquel** por su fuerza y porque siempre me ha sacado una sonrisa con su humor. A **María Torrente** que me demostró su amistad y tantos buenos ratos hemos pasado. A **Amelia** porque ha hecho que aprenda a ser más luchadora.

A **Jesús Borreguero** porque es una bellísima persona, y siempre está disponible para hacer ciencia por mucho trabajo que pueda tener en clínica. Por enseñarme todo lo que se de ecografías en ratón y porque su ilusión por el estudio de imagen en ratón me ha hecho ilusionarme siempre. Gracias también a **Ana Vanesa** por estar siempre pendiente de todo cuanto nos hace falta.

A **Katia** porque es una excelente persona, por los buenos momentos que hemos pasado en el labo entre Southerwestern, en la IRA y dentro de nuestro "organizado desorden". Pero sin duda por descubrirme a una autentica amiga en mi estancia en Boston y por apoyarme en el último tramo de este camino aunque fuera en la distancia.

A **Andrea**, mi alma gemela y amiga. Porque desde el principio me hizo un hueco en su vida y ha sabido comprenderme. Por su apoyo y amistad, por todas las vivencias dentro y sobretodo fuera de la ciencia, y porque la llevaré siempre.

A **Juanjo** porque es un crack y me ha ayudado en todo lo que he necesitado simplemente con pedirlo. Y porque siempre nos da la visión masculina de todo entre tanta mujer. A **Bahía** por su tranquilidad y amabilidad. Por enseñarnos todo sobre sus costumbres sin importarle muchas veces cual fuera la pregunta. A **Eli** por su sonrisa y su ironía que tanto me hacen reír. A **Mariajo** por ser tan risueña e irradiar felicidad..... y por saber tanto de "looks".

También quiero agradecer a la gente del laboratorio del Dr. **Vicente Andrés**. En especial a él porque me dio la oportunidad de descubrir el mundo de la placa de ateroma. A **María Jesús** porque es un encanto de persona, por enseñarme a cortar y abrir de forma tan meticulosa las arterias, por todo el tiempo que me ha dedicado y por ser siempre tan amable y cariñosa conmigo. A **Pedro** con el que he compartido ratos de estrés colectivo y muchos ratos de risas, por su forma de ser tan irónica que me encanta y que he disfrutado al máximo en el congreso de Japón. A **Ricardo** por sus consejos y porque es un científico excepcional. A **Alba, Carlos, Rafa, José**

María, Jaime porque me ha encantado compartir con ellos los ratos de charlas mientras pasaba las horas muertas cortando en el micrótopo. Gracias también a **David Sanz**, por ser tan amable y porque siempre ha pensado en mí y me ha dado la oportunidad de descubrir toda la buena gente y la buena ciencia que hay en el RIF de SEHLELHA, me ha encantado formar parte de ello y espero seguir haciéndolo.

A los "alicios" y "miguelangeles" nuestros compañeros, porque es un placer trabajar con ellos. Al resto de grupos del departamento, a la gente que he tenido más oportunidad de conocer gracias a la comisión de organización del retiro; Barbara, Ely, Regina, Fidel, Helena. Al último retiro en sí mismo porque creo que ha sido una gran experiencia para conocernos y compartir.

A nuestros secretarios **Almudena, Eduardo y Laura**. A Almu porque aunque le volvamos la cabeza loca con todas nuestras cosas sigue tan servicial como siempre. A Eduardo por su buen humor y por los ratos de confianzas. A Laura porque siempre te recibe con una sonrisa y un buenos días.

A **Antonio Jesús** porque es una máquina y siempre me ha ayudado con todos los papeleos y de forma súper eficaz. Por sus grandes dotes culinarias y como anfitrión y por haberme dejado participar de ellas.

A todas las unidades técnicas del CNIC, en especial a la unidad de Microscopía. Gracias a **Susana** por abrirme la puerta al mundo de la microscopía confocal y la imagen en 3D. A **Antonio** por su implicación y sus dotes con los programas de análisis de imágenes que de tantas nos han sacado.

Al **Dr. T. Minami**, por enseñarme lo diferente que puede ser la ciencia en el otro lado del planeta y porque aunque con el inglés no nos hemos entendido mucho sé que valora mi trabajo. Al **Dr. Walsh** por darme la oportunidad de vivir la experiencia de trabajar durante 2 meses en su laboratorio de la Universidad de Boston.

Al grupo de **la Dra. Mercedes Salaices** de la Facultad de Medicina y en especial a **Ana** por el esfuerzo realizado en sacar adelante el trabajo de contractibilidad vascular.

Al grupo del **Dr. José González** del Centro de Investigaciones Cardiovasculares de Barcelona y a **Cristina Rodríguez** por su trabajo en el estudio de Rcan1 en placas de aterosclerosis humana.

A toda la gente del día a día de CNIC que no son científicos pero que llenan mi tiempo aquí. A Angel, Elena y Loli de la cafetería. A Charo que me ha limpiado la mesa de trabajo aun teniéndola llena de papeles y con mi desorden particular, y tanta compañía me ha hecho en los días en los que me daban las tantas.

A mis biólogos **Ali, Alfredo, Elenuk, y Bea**, porque el amor a la biología nos unió en aquella facultad de biológicas de la UAM en el año 2003 y hasta ahora. Gracias por los ratos inolvidables en la biblio, en la sala polivalente con los tapers de lasaña y los rulos de papel de periódico para aguantar las ventanas, por todas las experiencias que hemos vivido juntos hasta en "Rumania". Porque aunque este trabajo nos haya hecho tomar caminos muy diferentes siempre tenemos un rato para vernos y contarnos nuestras vidas, y recordar todo lo vivido. Siempre os tendré presentes en todos mis pasos. Gracias también al biólogo acoplado **César** por sacar siempre mi vena más política y darme siempre su apoyo.

A mis amigos **Tere** y **Felipe** por ser como mi familia mientras vivía en Inglaterra. Porque aunque una esté en Perú y el otro en Italia, compartís mis alegrías y penas y estáis a mi lado como los más cercanos.

A los pinchitos **Paula, Miguelin, Luis y Susana**. Por todos los jueves que me habéis aguantado contando las alegrías y penurias de la ciencia y los experimentos. Porque sin saber mucho de este campo me habéis siempre aconsejado y apoyado alegrándome con vuestras cenas tan ricas. Mención especial para mi amigo Miguel por su gran esfuerzo en el maquetado de esta tesis, por aguantarme durante todos estos días tan estresantes y porque sin él no lo hubiera conseguido. A mi prima **Ana** que siempre está pendiente de mis pasos y me anima. A toda la gente especial de Santa, que todos sabéis quien sois, que me echáis de menos cuando no estoy y me hacéis sentir tan arropada cuando vuelvo, gracias de corazón. No me olvido de los **KeFisherman (Víctor y María)** que por muy liados que estén con todos sus temas de diseño y moda siempre se acuerdan de mí, espero que el paso que vamos a dar ambos profesionalmente nos traiga muchas cosas buenas.

A mi familia política; a **"los Ruiz"** y a **"los Carpio"** por su apoyo e implicación en todo lo relacionado con mi trabajo y porque me han apoyado de forma incondicional en este recorrido y creen en mí. Gracias a **Paqui y Miguel**, porque me han hecho sentir especial y valoran mi trabajo. Gracias también a **Merce** porque siempre ha estado atenta para ayudarme en todo lo que he necesitado y siempre dándome ánimos...ya sabes..... no me toques las palmas....!!!

Gracias a la pequeña piña de los Barbero García. A mi **tía Susana** que siempre me hace ver la realidad desde el punto de vista más sensato y me hace poner los pies en la tierra. A mi **tío Alfonso** por ser tan cariñoso y apoyarme siempre en mis estudios, todavía recuerdo las clases particulares de matemáticas en la carrera..., a mis chicos **Ángela y Diego** que quiero como hermanos y que han vivido de cerca toda mi trayectoria. A mi **abuelo Ángel** porque es la persona más fuerte que conozco en este mundo, y el único capaz de estar en la UCI contándole a los médicos la importancia de la investigación que lleva a cabo su nieta...increíble. A la más importante de todos y que nos dejó sin darnos tiempo a asimilarlo, y que estoy segura que es la persona que más hubiera disfrutado viendo esta tesis. A esa persona que llevaba dentro del monedero un recorte de mi primer artículo para enseñárselo a la gente, aunque nadie supiera muy bien que significaba....estés donde estés, estás conmigo **abuela**.

Gracias a los Méndez Zurutuza, mi **tía Belén, Marisa**, que sé que me siguen en este camino. En especial a mi **tía Rosa** por ser tan servicial y estar tan pendiente de que todo salga bien, porque siempre ha puesto la guinda final o todos mis trabajos con su especial maquetado de las portadas. A **Iñaki** por hacernos sentir desde el primer momento siempre como en casa.... *Eskerrik asko*. A mi **abuela Sebi** porque este donde este me da fuerzas, y siempre recordaré las tardes de grandes charlas a su lado.... *Bihotzean daramazaitut*. También gracias a la familia de Beasain, en especial a Luisa.

A **Miguel** porque es mi punto de apoyo; el blanco cuando todo es negro, el que me hace reír, el que me ha ayudado siempre a tomar las decisiones más correctas, el que me saca del hueco cuando no hay escalera por la que subir....Gracias porque siempre me has apoyado haciéndome ver la cara positiva de las cosas, aunque en algunos casos hayas tenido que vivir la peor parte de ellas. Gracias por entender que la ciencia es así.

A mis **padres** que tanto me han apoyado en todo, por ofrecerme tantas posibilidades en esta vida para conseguir este sueño.... porque este sueño es también el suyo. A mi padre que es mi ejemplo a seguir y la persona que más admiro en este mundo. Gracias por ser mi consejero y por educarme siempre en el esfuerzo y la superación. A mi madre que siempre está pendiente de mi bienestar y mi felicidad y que tanto valora mi esfuerzo, gracias por darme fuerzas día a día y con tanto cariño, sin ellas hubiera sido imposible continuar. A mi **hermana** porque ha estado cerca de mí en todas las decisiones que he ido tomando y me aporta la confianza en mí misma que a veces pierdo. Porque es mi otro yo y sabe lo que pienso y siento en cada momento. Gracias también al argandño más especial, **Félix**.

También al Ministerio de Educación, porque gracias a becas como estas descubrimos el valor de la ciencia en nuestro país, y porque espero que pueda haber muchos científicos como yo que en el futuro sean afortunados de poder disfrutarlas.

Gracias a todos los que se me hayan podido olvidar.

Nerea



ÍNDICE

Abreviaturas	1
Resumen	7
Summary	11
Introducción	15
1. Sistema cardiovascular.....	17
1.1 Estructura de las arterias.....	17
1.1.1. Aorta.....	17
1.2. Homeostasis del sistema cardiovascular.....	19
1.2.1. Sistema de regulación de la presión arterial: sistema renina-angiotensina	20
2. Remodelado vascular.....	23
2.1. Tipos de remodelado: Clasificación.....	24
2.2. Patologías de remodelado vascular.....	24
2.2.1. Formación de neointima	24
2.2.2. Aneurismas abdominales aórticos (AAA).....	25
2.2.3. Aterosclerosis.....	26
2.3. Tratamiento y modelos de estudio de las patologías de remodelado vascular	27
3. Ruta Calcineurina/NFAT	28
3.1. Inhibidores de CN	29
3.1.1. Farmacológicos: Ciclosporina A y FK506.....	29
3.1.2. Peptídicos: VIVIT y LxVP.....	31
3.1.3. Proteínas endógenas	31
4. Regulador de Calcineurina (RCAN).....	32
4.1. RCAN1	32
4.2. Isoformas de RCAN1	33
4.3. Regulación de CN mediada por RCAN.....	34
4.4. RCAN1 y enfermedades.....	34
Objetivos.....	37
Materiales y métodos	41
1. Animales.....	43
2. Procedimientos en animales	43
2.1. Modelo de infusión de AngII en ratón.....	43
2.2. Modelo de desarrollo de Aneurisma Abdominal Aórtico en ratones <i>Apoe</i> ^{-/-} por infusión de AngII	44
2.3. Modelo de daño en arteria femoral.....	45
2.4. Modelo de aterosclerosis inducida por dieta grasa en ratones <i>Apoe</i> ^{-/-}	46
2.5. Trasplante de médula ósea	47
2.6. Inoculación intravenosa de lentivirus en arteria yugular	48

2.7. Modelo de migración de macrófagos in vivo	48
3. Procesamiento de muestras humanas	48
4. Cultivos celulares.....	49
4.1. Células de músculo liso vascular (CMLVs) de rata y de ratón	49
4.2. Células endoteliales de pulmón de ratón (MLECs).....	49
4.3. Macrófagos peritoneales.....	50
5. Transfección.....	50
5.1. CMLVs	50
5.2. HEK293T (para producción de partículas lentivirales).....	51
6. Producción de lentivirus y adenovirus e infección	51
6.1. Infección de CMLVs con lentivirus	52
6.2. Infección de CMLVs con adenovirus.....	52
6.3. Infección de macrófagos peritoneales con lentivirus	52
7. Ensayos de migración	53
7.1. Ensayos de transwell.....	53
7.2. Ensayos de cierre de herida	53
8. Ensayos de actividad calcineurina	54
9. Inmunofluorescencia en CMLVs <i>in vitro</i>	54
10. Marcaje de macrófagos	54
11. Ensayos de expansión celular	55
12. Ensayos de formación de células espumosas	55
13. Microscopía de Laurdan GP.....	55
14. Ensayos de acumulación y salida de colesterol	56
15. Ensayos de presentación de antígeno	57
16. Ensayos de fagocitosis	57
17. Análisis histológico.....	57
17.1. Procesamiento de tejidos	57
17.2. Inmunohistoquímicas e Inmunofluorescencias	58
17.3. Tinciones de tejidos con colorantes.....	60
17.3.1. <i>Tricrómico de Masson</i>	60
17.3.2. <i>Hematoxilina & Eosina</i>	60
17.3.3. <i>Van Gieson</i>	60
17.3.4. <i>Oil Red O</i>	60
17.3.5. <i>Tinciones de aorta completa con Oil Red (en face)</i>	60
17.4. Ensayo de Southwestern <i>in situ</i>	61
18. Método Óptico No –lineal en 3D (NLO-3D)	61
19. Extracción de ácidos nucleicos y PCR cuantitativa.....	62

20. Ensayo de arrays (agilent gene).....	64
21. Inmunoblot	64
22. Analisis estadistico.....	65
Resultados	67
RUTA ANGII/CN/NFAT	69
1. AngII activa la ruta CN/NFAT en CMLVs.....	69
2. La CN regula la migración inducida por AngII en CMLVs	71
3. La CN es un mediador del remodelado vascular patológico inducido por AngII...	72
3.1. La CN es un mediador de la formación de neoíntima inducida por AngII y daño femoral	72
3.2. La CN es un mediador de la formación de AAA inducidos por AngII	73
4. Identificación de genes regulados por el eje AngII/CN en CMLVs	76
4.1. AngII induce la expresión de Rcan1 en CMLVs vía activación de CN.....	77
FUNCIONES DEL REGULADOR DE CN RCAN1	79
1. Rcan1 es un mediador central en la inducción de migración de CMLVs por AngII ..	79
2. Papel de Rcan1 en remodelado vascular inducido por AngII	81
2.1. Rcan1 participa en la formación de neoíntima	81
2.2. La ausencia de Rcan1 previene la formación de AAA	82
3. Papel de Rcan1 en remodelado vascular aterosclerótico	84
3.1. La expresión de Rcan1-4 está inducida en placas de aterosclerosis humana y de ratón	84
3.2. La inactivación genética de Rcan1 disminuye el desarrollo de placa de ateroma	87
3.3. Funciones de Rcan1 en macrófagos	93
3.3.1. <i>Rcan1 regula la expresión de CD36 y media la formación de células espumosas.....</i>	93
3.3.2. <i>Rcan1 regula la migración de macrófagos inhibida por LDLox</i>	97
3.3.3. <i>Papel de Rcan1 en la expansión de los macrófagos.....</i>	100
3.3.4. <i>Papel de Rcan1 en la polarización de macrófagos.....</i>	100
4. La expresión de Rcan1 en células hematopoyéticas es esencial para la progresión de la aterosclerosis, pero no para la formación de AAA	102
4.1. La expresión de Rcan1 en células hematopoyéticas no es necesaria para el desarrollo de AAA.....	104
4.2. La expresión de Rcan1 en células hematopoyéticas desempeña un papel central en el desarrollo de la aterosclerosis	104
5. La ausencia de Rcan1 no altera la actividad CN en tejido aórtico, CMLVs y macrófagos	106

Discusión	109
CN en migración y proliferación de CMLVs	112
Rcan1 como mediador de la migración de CMLVs y macrófagos cargados con LDLox	113
Rcan1 en la formación de AAA y de neoíntima.....	114
Rcan1 como mediador del desarrollo de placa de aterosclerosis en humano vs ratón	115
Contribución de Rcan1 de distintos compartimentos celulares al remodelado vascular.....	115
Rcan1 como regulador de fenotipo de macrófagos lesionales en aterosclerosis	117
La función de Rcan1 en remodelado vascular no está mediada por cambios en la actividad CN	120
Rcan1 como diana terapéutica en remodelado vascular.....	120
Conclusiones	123
Bibliografía	127
Anexo I	
Anexo II	
Anexo III	

A microscopic image of tissue, likely a histological section, showing various cellular structures and staining. The tissue is stained with a combination of red and blue dyes, highlighting different components. The red staining is prominent in the lower right quadrant, while the blue staining is more widespread, particularly in the upper left and middle sections. The overall texture is granular and complex, typical of biological tissue at the cellular level.

ABREVIATURAS

AAA	Aneurismas Abdominales Aórticos
Adapt78	Regulador de Calcineurina 1
AngII	Angiotensina II
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AKAP79	Proteína de anclaje a la proteína quinasa A (<i>A Kinase-Anchoring Protein 79</i>)
Akt	Proteína quinasa B
ANOVA	Análisis de varianza entre grupos (<i>ANalysis Of VAriance</i>)
AP1	Proteína activadora 1 (<i>Activator Protein 1</i>)
Apoe^{-/-}	Ratones deficientes en la apolipoproteína E
Apoe^{-/-}Rcan1^{-/-}	Ratones deficientes en la <i>Apoe</i> y deficientes en <i>Rcan1</i> .
Arg1	Arginasa 1
ARN	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico.
AT₁R	Receptor de angiotensina tipo I
AT₁RB	Antagonista de AT ₁ R
AT₂R	Receptor de angiotensina tipo II
AT₂RB	Antagonista de AT ₂ R
α-MHC	Cadena pesada de la alpha-miosina (<i>alpha myosin heavy chain</i>)
BSA	Albumina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
Cabin1	Proteína de unión a calcineurina 1 (<i>Calcineurin Binding Protein 1</i>)
CaM	Calmodulina (<i>Calmodulin</i>)
CL	Colesterol libre
CMLV	Células de Músculo Liso Vascular
CN	Calcineurina
CnA	Calcineurina A
CnB	Calcineurina B
CO₂	Dioxido de carbono
CPRG	Rojo de clorofenol-β-Dgalacto-piranoside
COX2	Ciclooxigenasa 2 (<i>Cyclooxygenase 2</i>)
CsA	Ciclosporina A (<i>Cyclosporin A</i>)
CypA	Ciclofilina A (<i>Cyclophilin A</i>)
CT	Colesterol Total
C57BL/6	Animales de fondo silvestre.

Abreviaturas

DAG	Diacilglicerol
DMEM	<i>Dulbecco Modified eagle 's médium</i>
DSCR1	Región crítica del Síndrome de Down 1(<i>Down Síndrome critical región 1</i>)
DTT	Ditiotreitol
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
ECL	Quimioluminiscencia aumentada (<i>Enhanced Chemiluminescence</i>)
ECGF	Factores de crecimiento de células endoteliales (<i>Endothelial cells growth factors</i>)
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EGTA	Acido etilen-glicotetra-acético
ET-1	Endotelina 1
FBS	Suero fetal bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FKBP	Proteína de unión a FK506 (<i>FK506 Binding protein</i>)
FK506	Tacrolimus
GCSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos (<i>Granulocyte-Colony Stimulation Factor</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GMCSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (<i>Granulocyte-Macrophage Colony Stimulation Factor</i>)
GSK3	Quinasa de la sintasa de glicógeno 3 (<i>Glycogen Synthase Kinase 3</i>)
HDL	Lipoproteína de alto peso molecular (<i>High Density Lipoprotein</i>)
HEK 293	Células embrionarias humanas de riñón (<i>Human Embryonic Kidney</i>)
HE	Hematoxilina & Eosina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
HFD	Dieta rica en colesterol y grasas (<i>High Fat Diet</i>)
IF	Inmunofluorescencia
IgG	Inmonoglobulina G
IHQ	Inmunohistoquímica
iNos	Sintasa inducible de óxido nítrico (<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>)
IL	Interleuquina
IP₃	Inositol 1, 4, 5 trifosfato
Io	Ionóforo de calcio
IRES	Sitio interno de entrada del ribosoma (<i>Internal Ribosome Entry Site</i>)

JAK	Receptor Janus quinasa (<i>Janus Kinase</i>)
KDa	Kilodalton
KO	<i>Knock out</i>
LDL	Lipoproteínas de bajo peso molecular (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
LDLac	Lipoproteínas de bajo peso molecular acetiladas
LDLox	Lipoproteínas de bajo peso molecular oxidadas
LPS	Lipopolisacárido (<i>Lipopolysaccharide</i>)
MAPK	Proteína quinasa activadora de mitógeno (<i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
MCP-1	Proteína quimio-atrayente de monocitos (<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MCIP1	Proteína de interacción con Calcineurina 1 (<i>Calcineurin Interacting Protein 1</i>)
MMLV-RT	Transcriptasa reversa del virus de la leucemia (<i>Murina Moloney Murine leukemia virus reverse Transcriptase</i>)
Mrc1	Receptor de manosa 1 (<i>Mannose Receptor 1</i>)
M1	Macrófagos pro-inflamatorios
M2	Macrófagos anti-inflamatorios
n	Número de experimentos realizados
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT/BCIP	Nitroblue tetrazolium clorídrico/5 bromo-4 cloro 3 indolilfosfato
NFAT	Factor nuclear activador de células T (<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>)
NFκB	Factor nuclear κB (<i>Nuclear Factor κB</i>)
NHR	Región de homología de NFAT (<i>NFAT Homology Region</i>)
NLO-3D	Método óptico no-lineal en 3D (<i>Non Lineal Optical 3D Method</i>)
NP-40	Nonidet p40
OVA	Ovoalbúmina
OCT	Compuesto de temperatura óptima para el corte (<i>Optimal Cutting Temperatura compound</i>)
PBS	Buffer fosfato salino (<i>Phospate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción de polimerasa en cadena (<i>Polimerase chain reaction</i>)
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (<i>Platelet-derived growth factor</i>)
PFA	Paraformaldehído
PyK2	Proteínas intracelulares tirosin quinasa familia Fak (<i>Tyrosine kinase of the Fak family</i>)

Abreviaturas

PLC	Fosfolipasa C
PMA	Miristato acetate de formol (Formol myristate acetate)
PMSF	Fluorurofenilmetano sulfonil (<i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i>)
PSF	<i>Polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor</i>
qPCR	PCR cuantitativa
Rcan1	Regulador de actividad Calcineurina 1 (<i>Regulator of Calcineurin 1</i>)
<i>Rcan1</i>^{-/-}	Ratones deficientes en Rcan1
Rcan1-1	Rcan1 isoforma 1-1
Rcan1-4	Rcan1 isoforma 1-4
Rcn1	Regulador de calcineurina 1 en levaduras.
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecil sulfato de sodio (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Error estándar de la media (<i>Standard Error of the Mean</i>)
SFFV	<i>Spleen focus forming virus</i>
SMA	Actina de musculo liso (<i>Smooth muscle actin</i>)
SRA	Sistema Renina Angiotensina
SR-A	<i>Scavenger receptor A</i>
Src	Proteínas intracelulares tirosin quinasa familia Src
SRY	Región determinante del sexoY (<i>Sex-Determining región Y</i>)
STAT	Traductor de señales y activador de la transcripción (<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>)
TE	Tris EDTA
TBS-T	Buffer Tris Salino con Tween (<i>Tween-containing Tris-Buffered Saline</i>)
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β (<i>Transforming Growth Factor β</i>)
TGA	Triglicéridos
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VG	Van Gienson
VSV-G	Virus G de la estomatitis vesicular (<i>Vesicular Stomatitis Virus G</i>)

A microscopic image of tissue, likely a histological section, showing a complex arrangement of cells and fibers. The tissue is stained with a combination of red and blue dyes, highlighting various cellular structures and extracellular matrix components. The overall appearance is dense and textured, with a mix of dark and light areas.

RESUMEN

El remodelado de la pared vascular es un distintivo común que se observa en patologías y procesos como hipertensión, restenosis, aterosclerosis y aneurismas. Este remodelado que implica cambios en la masa de células de la capa media y afecta al tamaño del lumen del vaso, se caracteriza por la proliferación y migración de células de músculo liso vascular (CMLVs), la acumulación de elementos de matriz extracelular, y la presencia de células inflamatorias. Aunque la angiotensina II (AngII) desempeña un papel central en el remodelado vascular, en procesos como la formación de aneurismas y de neoíntima, aún se conoce poco de los mecanismos implicados en su participación. La identificación de moléculas efectoras de AngII implicadas en estos procesos podría ayudar al desarrollo de terapias que mejorasen el tratamiento de estas enfermedades. En este trabajo mostramos que AngII induce la migración de CMLVs y el desarrollo de aneurisma abdominal aórtico (AAA) y restenosis y que estos efectos son bloqueados por el tratamiento farmacológico con inhibidores de calcineurina (CN) o por la administración de péptidos inhibidores de CN mediante partículas lentivirales. El análisis transcriptómico de genoma completo en CMLVs reveló que >1500 genes son regulados por AngII, y que solo 11 de ellos requieren de la activación de CN para su regulación. De todos estos genes, el denominado regulador de CN 1 (*Rcan1*) es el gen activado por AngII más dependiente de CN. *Rcan1* se induce tanto *in vitro* como *in vivo* por AngII, y es necesario para la migración inducida por AngII en las CMLVs. Observamos que los ratones *Rcan1*^{-/-} son resistentes al desarrollo de AAA inducidos por infusión de AngII, y a la formación de neoíntima producida por daño femoral. También mostramos la inducción de la expresión de RCAN1 en lesiones ateroscleróticas humanas y de ratón, y que se induce en CMLVs, macrófagos y células endoteliales por su tratamiento con lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox). Mostramos que los ratones *Rcan1*^{-/-} presentan menos área de lesión y ateromas en estadios menos avanzados. Describimos que *Rcan1* regula en macrófagos la expresión de CD36, la captación de LDLox, la migración, y sus características inflamatorias. Nuestros resultados indican que aunque *Rcan1* está implicado en el desarrollo de aneurismas, su expresión en células hematopoyéticas no es esencial para este proceso. También, mostramos, sin embargo, que el trasplante de médula ósea *Rcan1*^{-/-} en ratones *Rcan1*^{+/+} confiere resistencia al desarrollo de placas de ateroma, definiendo así una función esencial de *Rcan1* en células hematopoyéticas en esta patología. Todos estos resultados aportan una nueva visión de *Rcan1* como diana terapéutica en enfermedades de remodelado vascular como los AAA, la restenosis y la aterosclerosis.

A microscopic image of a tissue section, likely stained with Masson's trichrome. The image shows a dense arrangement of cells and fibers, with a prominent blue-stained area in the lower right corner. The overall texture is granular and complex, typical of histological preparations.

SUMMARY

Artery wall remodeling, a major feature of diseases such as hypertension, restenosis, atherosclerosis, and aneurysm, involves cellular processes including altered vascular smooth muscle cell (VSMCs) growth, migration and differentiation, increased extracellular matrix deposition and inflammation. Pathological vessel remodeling triggers changes in the tunica media mass that reduce or increase the vessel lumen. Angiotensin II (AngII) is a key effector of aortic wall remodeling that contributes to aneurysm formation and restenosis through incompletely defined signaling pathways. The identification of molecules involved in vessel remodeling could aid the development of improved treatments for these pathologies. Here we have showed that AngII induces VSMC migration and vessel remodeling in mouse models of restenosis and aneurysm. These effects were prevented by pharmacological inhibition of calcineurin (CN) or lentiviral delivery of CN-inhibitory peptides. Whole-genome analysis revealed >1,500 AngII-regulated genes in VSMCs, with just 11 of them requiring CN activation. Of these, the most sensitive to CN activation was regulator of CN 1 (Rcan1). Rcan1 was strongly activated by AngII *in vitro* and *in vivo* and was required for AngII-induced VSMC migration. Remarkably, *Rcan1*^{-/-} mice were resistant to AngII-induced aneurysm and neointima formation after femoral injury. Atherosclerosis, a complex inflammatory disease, also involves extensive vascular vessel remodeling and migration of vascular cells. We also show that RCAN1 is induced, in human and mouse atheroma lesion. Indeed Rcan1 is induced in lesional macrophages, endothelial cells and VSMCs by treatment of these cells with oxidized LDLs (oxLDLs). *Rcan1* genetic inactivation diminished atherosclerosis lesion severity and extension in *Apoe*^{-/-} mice. We show that this effect was mechanistically linked to CD36 downregulation, diminished oxLDL uptake resistance to oxLDL-mediated inhibition of macrophage migration and to induction of anti-inflammatory properties in macrophages. By using bone marrow transplantation, we show that Rcan1 expression is not required in hematopoietic cells for aneurysm development. In contrast, our data indicate that transplantation of *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} bone marrow cells into *Apoe*^{-/-} recipients confers atherosclerosis resistance, thus defining a major role for Rcan1 in hematopoietic cells in atherosclerosis progression. Together, our findings provide a new vision of Rcan1 as an essential target in pathological vessel remodeling, and support that therapies aimed at inhibiting RCAN1 expression or function might significantly reduce aneurysm, restenosis and atherosclerosis burden.

A microscopic image of a tissue section, likely stained with hematoxylin and eosin (H&E). The image shows a dense cellular structure with various shades of pink, red, and blue. The tissue appears to be a cross-section of an organ, possibly the liver or kidney, showing complex cellular architecture and some larger, lighter-colored areas that might be cysts or necrotic regions. The overall texture is granular and detailed.

INTRODUCCIÓN

1. El sistema cardiovascular

El sistema cardiovascular es el primero de los sistemas funcionales en desarrollarse durante la embriogénesis de vertebrados, lo cual remarca su papel como principal encargado del mantenimiento de la homeostasis corporal. El sistema cardiovascular está compuesto por el corazón y por una red de vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares) que conforman una estructura ramificada y organizada que permite el aporte de nutrientes y oxígeno a todas las partes del organismo.

1.1. Estructura de las arterias

Las arterias se encargan del transporte de la sangre oxigenada desde el corazón al resto del cuerpo, exceptuando el caso de la arteria pulmonar que lo haría de forma inversa. Estos vasos son imprescindibles para el mantenimiento fisiológico del tono vascular, ya que regulan los cambios de presión y flujo sanguíneo gracias a la naturaleza elástica y contráctil de sus paredes. La pared arterial consta de tres capas concéntricas independientes, y muy bien definidas: íntima, media y adventicia. Estas capas componen una estructura organizada que garantiza la integridad y funcionalidad de los vasos (Libby et al., 2011) (Fig. 1).

La capa íntima o interna, es la más cercana al lumen del vaso y está constituida por una monocapa de células endoteliales interconectadas y adheridas a una lámina basal. Esta capa, además de actuar como barrera de protección ante agentes externos, hace de nexo de comunicación para la transmisión de señales o estímulos procedentes del torrente sanguíneo a la pared del vaso.

De forma concéntrica a la capa íntima nos encontramos con la capa media, delimitada por una lámina elástica interna y otra externa, entre las cuales se encuentran dispuestas de forma circular al vaso las células de músculo liso vascular (CMLVs). El calibre de la arteria depende del número de hileras de CMLVs residentes que formen esta capa media. Las CMLVs además tienen como función imprescindible el mantenimiento de la integridad y del tono vascular gracias a su naturaleza contráctil.

Por último, tenemos la capa externa o adventicia, formada por una red de tejido conjuntivo compuesto principalmente por fibroblastos y colágeno y en la que encontramos inmersos nervios y poblaciones de leucocitos residentes.

1.1.1. Aorta

La aorta es la principal arteria del organismo, encargada de transportar y distribuir la sangre oxigenada a todas las arterias. Es una arteria de naturaleza elástica y extensible,

que durante la sístole, fase en la que el corazón inyecta sangre, se expande manteniendo la presión sanguínea, y durante la fase de diástole se contrae. En condiciones fisiológicas su diámetro oscila en torno a 1 mm en ratones y 2.5 cm en humanos, pudiendo alcanzar los valores de 2 mm y 5 cm, respectivamente, en algún tramo específico en condiciones patológicas. La aorta tiene varias partes diferenciadas a lo largo de su recorrido (Baliga et al., 2014) (Fig. 2):

- Aorta ascendente: es el primer recorrido de la arteria y abarca el tramo comprendido entre la base del ventrículo izquierdo y el inicio del cayado aórtico. En su origen en el interior del ventrículo, la arteria presenta una convexidad que da lugar a las denominadas válvulas aórticas, encargadas de controlar la unidireccionalidad de la sangre.
- Cayado aórtico: Su porción central en forma de u invertida da origen a 3 ramificaciones muy importantes correspondientes al tronco braquiocefálico, y a las arterias carótida y subclavia.
- Aorta descendente: se denomina así a la región que va desde el cayado aórtico hasta las arterias ilíacas. La aorta descendente a su vez se divide en:
 - Aorta Torácica: tramo de la aorta descendente que se encuentra sobre el diafragma y que se extiende desde el cayado aórtico.
 - Aorta Abdominal: porción que va desde el diafragma a la ramificación de las arterias ilíacas.

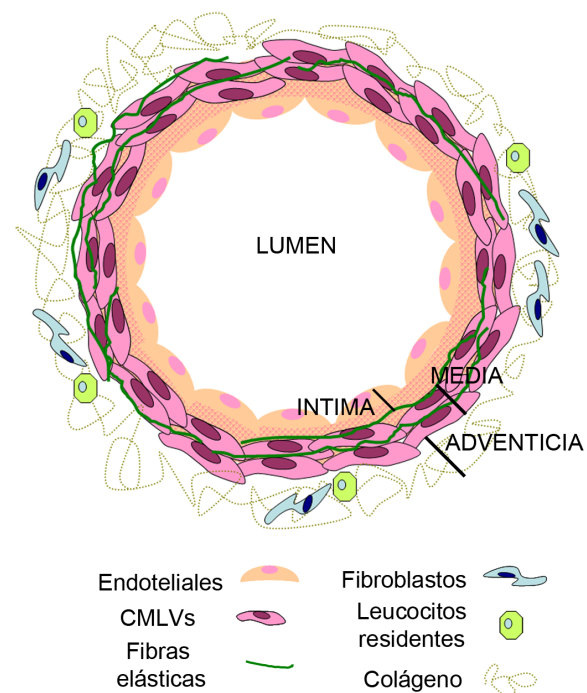


Figura 1. Estructura arterial. Esquema de la organización en capas de la pared arterial. En ella encontramos tres capas definidas (las líneas negras marcan los límites de cada capa): la capa íntima, formada por una línea de células endoteliales; la capa media, formada por CMLVs dispuestas sobre fibras elásticas; y la capa adventicia, donde encontramos fibroblastos, leucocitos residentes y matriz de colágeno.

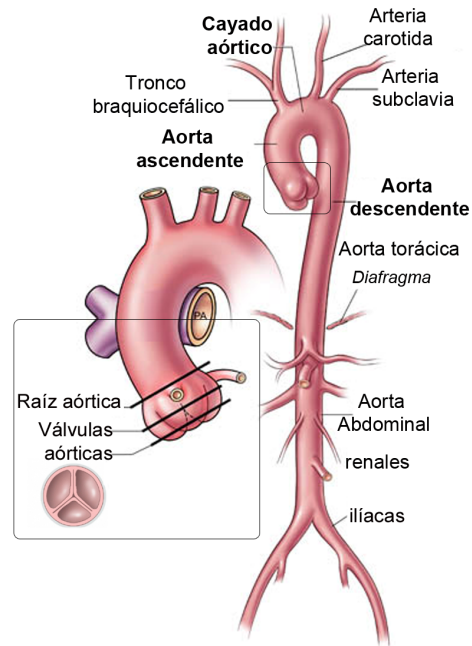


Figura 2. Anatomía de la aorta. Esquema que muestra las diferentes regiones a lo largo del recorrido de la arteria aorta: el cuadrado muestra un aumento de la zona de aorta ascendente donde se encuentran las válvulas aórticas.

1.2. Homeostasis del sistema cardiovascular

El correcto funcionamiento del sistema cardiovascular depende de una compleja red de interacciones a nivel mecánico y a nivel celular: entre las propias células de la pared vascular (endotelio y músculo liso) y los componentes celulares/bioquímicos del torrente circulatorio.

En el organismo, la sangre circula debido al efecto generado por el trabajo cardíaco, combinado con las propiedades mecánico-elásticas de los vasos sanguíneos. De esta manera, la sangre discurre alrededor del circuito cardiovascular ejerciendo en la pared de los vasos una fuerza denominada presión sanguínea, que se registra de manera desigual en las diferentes localizaciones del árbol vascular. El organismo registra y controla este parámetro de presión sanguínea en cada instante a través de detectores de presión (barorreceptores).

En condiciones fisiológicas, la pared vascular está expuesta a cambios hemodinámicos continuos debidos a variaciones de presiones en el lumen del vaso (Heeneman et al., 2007). En esas condiciones, las CMLVs que conforman la capa media se encuentran quiescentes, con un fenotipo contráctil. Estas células son capaces de relajarse o contraerse en función de las necesidades, manteniendo el tono vascular por dilatación

o constricción del vaso (Schaper and Ito, 1996; Wolf et al., 1998). Sin embargo, en condiciones de daño o reparación fisiológica de tejidos se induce un cambio de fenotipo de las CMLVs, que pasan de tener un fenotipo contráctil a adoptar un fenotipo migratorio y proliferativo. En esta respuesta participan otros tipos celulares, e implica la integración de un gran número de estímulos, incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), o angiotensina II (AngII) (Louis and Zahradka, 2010). Estos cambios fenotípicos pueden ser reversibles, por lo que posteriormente a la reparación, las CMLVs son capaces de retomar su fenotipo contráctil. Si por el contrario no lo hacen, debido a un mantenimiento de las señales proliferativas, se desencadenan los fenómenos de remodelado vascular y la aparición de lesiones en la capa íntima (Ridley et al., 2003; Schaper and Ito, 1996; Wolf et al., 1998).

1.2.1. Sistemas de regulación de la presión arterial: sistema renina-angiotensina.

La regulación endógena de la presión arterial tiene como objetivo el mantenimiento de la homeostasis vascular, y por ello ha sido durante mucho tiempo un importante campo de estudio. Se han descrito varios sistemas implicados en esta regulación, pero sin duda uno de los más importantes es la regulación llevada a cabo por el sistema renina-angiotensina (SRA).

El SRA es el principal regulador de la función renal y cardiovascular, ya que presenta un papel clave en la homeostasis de la presión arterial y en el balance de electrolitos (Ferrario and Strawn, 2006). Este sistema se activa cuando hay pérdida de volumen sanguíneo, caída de la presión sanguínea y, en especial, cuando hay aumento de la osmolaridad del plasma. Comienza con la activación de los barorreceptores situados en determinados órganos y también en diferentes zonas arteriales, que detectan una disminución de la presión arterial. Esto provoca una activación del sistema nervioso simpático que desencadena una vasoconstricción sistémica y la liberación de renina por parte del riñón. La renina es una proteasa capaz de procesar el Angiotensinógeno (molécula precursora de la ruta) y formar así el decapeptido Angiotensina I. Este péptido, a su paso por los pulmones, es a su vez cortado por la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que lo transforma en el péptido activo de la ruta, que es la angiotensina II (AngII) (Danilczyk and Penninger, 2006) (Fig. 3).

La AngII es el péptido efector del SRA, lo que la convierte en uno de los factores más importantes, tanto en los procesos fisiológicos de mantenimiento de la presión arterial, como en procesos patológicos de remodelado vascular (Berk, 2001). AngII,

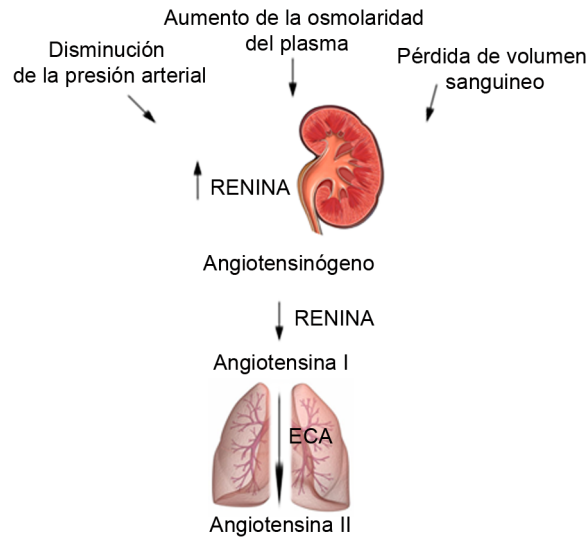


Figura 3. Resumen del sistema renina-angiotensina. En respuesta al aumento de la osmolaridad del plasma, la disminución de la presión arterial o la pérdida de volumen sanguíneo, se desencadena la liberación de renina por parte de los riñones. La renina procesa el Angiotensinógeno a Angiotensina I. Posteriormente Angiotensina I es convertida en AngII por la ECA.

en condiciones fisiológicas, puede alterar el tono vascular, produciendo un aumento de la presión sanguínea, así como provocando retención de sodio y agua en los túbulos renales (Qin, 2008). Pero, además de ser un potente vasoconstrictor, a nivel celular AngII contribuye en condiciones patológicas a la disfunción de CMLVs. Es capaz de regular el crecimiento celular (proliferación/hipertrofia y apoptosis), la fibrosis, y puede desencadenar un remodelado estructural en respuesta a un daño (Touyz, 2005). Asimismo, AngII estimula la migración de CMLVs, proceso muy importante para el remodelado vascular (Greene et al., 2001). Además, en los últimos años, nuevos estudios apuntan a la naturaleza de AngII como una auténtica citoquina, con importante papel en la respuesta inflamatoria (Ruiz-Ortega et al., 2001). La mayoría de estos estudios describen el comportamiento pro-inflamatorio de AngII en enfermedades vasculares, destacando su participación en la regulación del desarrollo de aneurismas y de la formación de neoíntima en modelos animales y en humanos (Daugherty et al., 2000; Heeneman et al., 2007; Weintraub, 2009). Asimismo, cabe remarcar que las acciones de AngII sobre CMLVs parecen estar determinadas por el tiempo de exposición; de esta forma, mientras que la exposición puntual a AngII es necesaria para la fisiología normal del tejido y para los procesos de reparación, la exposición crónica induce un fenotipo migratorio y proliferativo de estas células, así como secreción de componentes de matriz extracelular, ambos procesos implicados en el desarrollo y mantenimiento de patologías de formación de neoíntima (Louis and Zahradka, 2010) (Fig. 4).

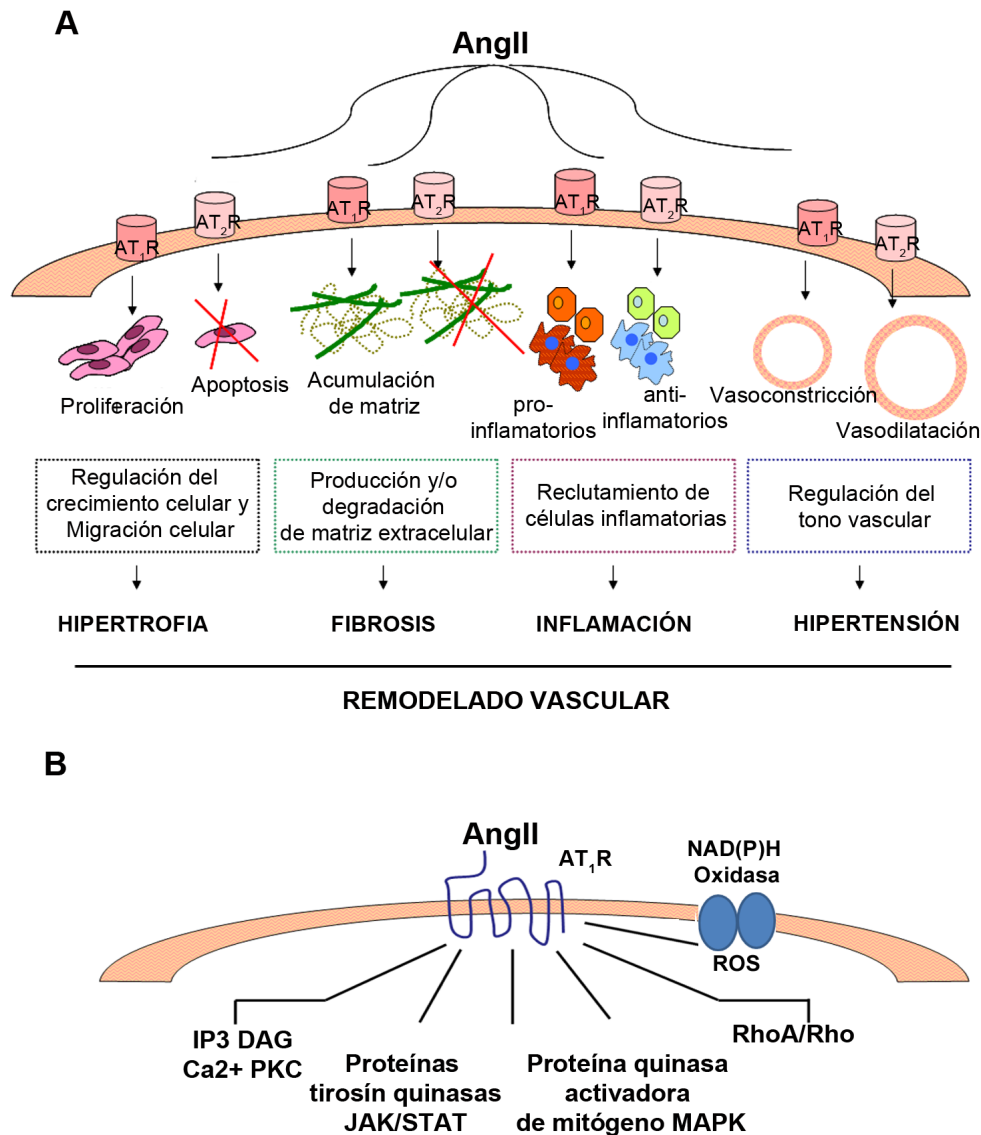


Figura 4. Procesos y rutas de señalización intracelular estimulados por AngII en CMLVs (A) Respuestas celulares y mecanismos moleculares activados por AngII vía receptores AT₁ y AT₂ en CMLVs. **(B)** Rutas de señalización mediadas por AngII a través del receptor AT₁ en CMLVs.

AngII actúa a través de dos subtipos de receptores acoplados a proteínas G que han sido bien caracterizados: receptor de angiotensina tipo I y tipo II (AT₁R, AT₂R) (Hunyady and Catt, 2006; Porrello et al., 2009). En células humanas encontramos un único receptor AT₁, mientras que en rata y ratón el receptor AT₁ presenta dos isoformas AT_{1a} y AT_{1b} (Burson et al., 1994). El receptor AT_{1a}, es el homólogo murino más parecido al receptor AT₁ de humanos, el mejor caracterizado y el que media la mayoría de las acciones descritas de AngII en el sistema vascular (Benigni et al., 2010). Este receptor se expresa principalmente en los órganos implicados en la regulación de la presión sanguínea como son: el corazón (expresándose en cardiomiocitos y fibroblastos), los vasos sanguíneos (CMLVs), el riñón, la glándula adrenal, el pulmón y el cerebro (Allen et al., 2000; de Gasparo et al., 2000).

El receptor AT_2 se expresa a niveles altos durante el desarrollo embrionario y disminuye en tejido adulto (Nahmias and Strosberg, 1995), localizándose en útero, riñón, pulmón y corazón (Matsubara, 1998). Su expresión puede regularse en condiciones patológicas de remodelado vascular y cardiaco y en condiciones de inflamación (Touyz, 2005). Ambos receptores, AT_1 y AT_2 , juegan papeles esenciales en la regulación vascular, pero mediante acciones opuestas tanto en el sistema vascular como en el sistema renal (Schulman and Raij, 2008). Mientras que el receptor AT_1 participa en el incremento de la presión sanguínea (vasoconstricción) (Ito et al., 1995), promueve el crecimiento celular (hipertrófia) (Geisterfer et al., 1988), la fibrosis (Touyz, 2005), y la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Ji et al., 2009), el receptor AT_2 induce vasodilatación en arterias de resistencia y de conductancia y disminuye la inflamación, la fibrosis y el crecimiento celular (Benigni et al., 2010) (Fig. 4A).

De esta forma, por unión al receptor AT_1 , la AngII induce la activación de diferentes vías de señalización en CMLVs, desencadenando una respuesta multifactorial y compleja. Entre las diferentes rutas de señalización celular se encuentran: la cascada de señalización mediada por fosfolipasa C (PLC)/inositol 1,4,5 trifosfato (IP3)/1-2 diacilglicerol (DAG), que regula la movilización de calcio intracelular (Alexander et al., 1985); la proteína quinasa activadora de mitógeno MAPK (Touyz and Schiffrin, 2000); las proteínas intracelulares tirosin quinasas Pyk2, Src y JAK/STAT (Marrero et al., 1995); o la vía de RhoA/Rho quinasa (Yamakawa et al., 2000). Además, AngII puede mediar otras acciones celulares a través de la activación de la NAD(P)H oxidasa que induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales tienen un papel fundamental en la regulación de la respuesta inflamatoria (Taniyama and Griendling, 2003) (Fig. 4B).

2. Remodelado vascular

Aunque los sistemas de regulación endógena de la homeostasis vascular están fisiológicamente muy controlados, el sistema es tan complejo que cualquier alteración o estímulo extraño podría suponer la pérdida del equilibrio y desencadenar una enfermedad cardiovascular. Las enfermedades cardiovasculares son la mayor causa de mortalidad en muchos países, suponiendo alrededor de 16,7 millones de muertes al año (Dahlof, 2010; Lloyd-Jones, 2010). En la mayoría de estas enfermedades, entre las cuales podríamos incluir la hipertensión, la restenosis o formación de neointima, la aterosclerosis y el desarrollo de aneurismas abdominales aórticos, el remodelado vascular es la característica estructural fundamental común (Pasterkamp et al., 2000; Pasterkamp et al., 2004; Ward et al., 2000). Aunque, el remodelado vascular se puede producir de forma fisiológica durante el crecimiento del organismo, la práctica de ejercicio o el embarazo, se entiende básicamente como un proceso pato-fisiológico complejo y reconocido en la mayoría de las patologías vasculares (Touyz, 2005). Este remodelado vascular ocurre en respuesta a determinados

estímulos, entre los que se incluyen cambios incontrolados de presión arterial, procesos de respuesta inflamatoria, alteraciones de la composición de la matriz, aumento de lípidos en sangre o daño mecánico de los vasos. Estos estímulos desencadenan una serie de cambios en la estructura y funcionalidad de la pared (Berk, 2001), caracterizados por alteraciones en el tamaño del lumen y en la capa media vascular (Heeneman et al., 2007).

2.1. Tipos de remodelado: Clasificación

El remodelado vascular ha sido clasificado en varias categorías en función de las alteraciones en el tamaño del lumen y en la capa media (Mulvany, 1998). Así el remodelado puede ser:

- Interno (*inward*): si se produce una disminución en el diámetro del lumen.
- Externo (*outward*): cuando hay un aumento del diámetro del lumen.

Además, este remodelado puede ir acompañado, a su vez, de un incremento o de una reducción de la masa de células de la capa media, sub-clasificándose así en remodelado Hipertrófico o Hipotrófico, respectivamente (Mulvany, 1998) (Fig. 5A). En la mayoría de los casos, el aumento en el número de células de la capa media está asociado a migración y proliferación de CMLVs residentes (Berk, 2001), que migrarían en respuesta a estímulos quimio atrayentes específicos liberados por monocitos/macrófagos, plaquetas, células endoteliales u otras CMLVs del vaso dañado (Goetze et al., 1999). En estos remodelados también se observa infiltración de células inmunes y acumulación de componentes de matriz extracelular, entre los procesos más destacados.

2.2. Patologías de remodelado vascular

2.2.1. Formación de neoíntima (o hiperplasia de la íntima)

El engrosamiento de la neoíntima (estenosis) es un término que se ha utilizado para denotar el estrechamiento del vaso debido a un remodelado vascular hacia el interior (*inward*), por aumento de la masa de células de la capa media (hipertrófico) (Heeneman et al., 2007). Cuando se produce un engrosamiento de la neoíntima, comúnmente en isquemias en corazón y obstrucciones arteriales periféricas, se suele realizar en humanos una angioplastia (Mintz et al., 1996). Sin embargo, posterior a esta intervención puede producirse una recurrencia de la estenosis a la que se le denomina restenosis (Fig. 5B). Dos importantes procesos celulares están implicados en el desarrollo de esta hiperplasia que desencadenan el estrechamiento del lumen; uno de ellos es la producción masiva de elementos de la matriz extracelular y el otro es la migración y proliferación de CMLVs (Welt and Rogers, 2002).

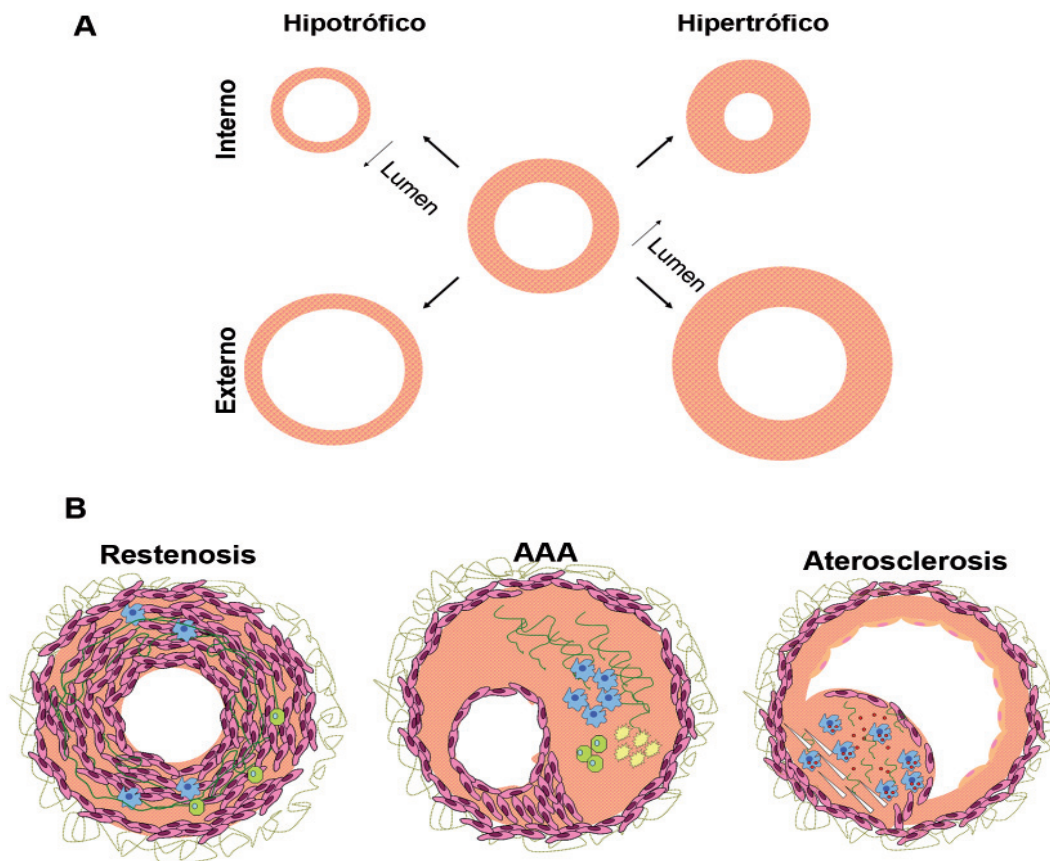


Figura 5. Tipos de remodelado vascular. (A) Diagrama que muestra las características de los diferentes tipos de remodelado de la pared vascular y su efecto sobre la masa de células de la capa media y el lumen arterial. **(B)** Diagrama del tipo de remodelado que sufre la pared del vaso durante los procesos patológicos de formación de neoíntima (restenosis), aneurisma abdominal aórtico (AAA) y aterosclerosis.

2.2.2. Aneurismas abdominales aórticos (AAA)

Al contrario de lo que ocurre en la restenosis, el remodelado que se observa en la pared de la arteria durante el desarrollo de aneurismas es un remodelado hipertrófico hacia el exterior del vaso (*outward*), tanto a nivel de dimensiones del vaso como a nivel de estructura (Heeneman et al., 2007). De esta forma, se produce una dilatación de la aorta que puede llegar a superar varias veces el diámetro normal (Daugherty et al., 2000; Johnston et al., 1991). Los aneurismas abdominales en humanos se desarrollan principalmente en la zona infrarrenal de la aorta abdominal cerca de las arterias ilíacas (Guo et al., 2006). Sin embargo, la porción abdominal más susceptible de sufrir la enfermedad en ratones es la suprarrenal (Daugherty and Cassis, 2004). En la enfermedad humana, el tabaco, la hipertensión, el sexo, la edad, las lesiones ateroscleróticas avanzadas o la predisposición genética (como es el caso de los pacientes con síndrome de Marfan) son factores de riesgo para el desarrollo de AAA (Forte et al., 2010). La pato-fisiología del AAA puede ser dividida en dos eventos que se encuentran íntimamente ligados: la degradación

de la matriz extracelular y la inflamación (Daugherty and Cassis, 2004). Histológicamente, la degradación de la matriz extracelular se caracteriza por la desorganización y ruptura de las elásticas de la capa media de la pared y un engrosamiento de ésta por acumulación de depósitos de colágeno (Hellenthal et al., 2009). Esta desorganización de la estructura elástica está asociada a migración y proliferación de CMLVs (Patel et al., 1996). Por otra parte, los procesos de inflamación se caracterizan por entrada de células inflamatorias a la pared de la arteria, como es el caso de los macrófagos, que además secretan factores inflamatorios activadores de células endoteliales, CMLVs o fibroblastos (Shimizu et al., 2005). La progresión de la enfermedad conlleva la continua expansión de la pared arterial por degradación de la elastina, deposición masiva de colágeno y neovascularización. Todo esto causa desestabilización de la pared y ruptura, provocando la formación de un trombo.

2.2.3. Aterosclerosis

La aterosclerosis es la mayor causa de infarto de miocardio, ictus o enfermedad arterial periférica, y se considera la mayor causa de muerte en países desarrollados (Hansson and Libby, 2006). Esta enfermedad se caracteriza por un aumento de colesterol en sangre o hipercolesterolemia que desencadena que las lipoproteínas de baja densidad (LDLs) presentes en el torrente sanguíneo se acumulen en la capa íntima de las arterias. Durante mucho tiempo se ha creído que la aterosclerosis era meramente la acumulación de colesterol en las paredes de los vasos. Sin embargo, actualmente se sabe que es una enfermedad más compleja y es considerada como una enfermedad inflamatoria crónica (Hansson and Hermansson, 2011). Cuando las partículas de LDLs se acumulan en la pared arterial, pueden sufrir modificaciones por oxidación y transformarse en lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox). La modificación de estas moléculas desencadena la activación del endotelio vascular, que favorece la extravasación de monocitos a la capa íntima de la pared del vaso (Mestas and Ley, 2008). Estos monocitos se diferencian a macrófagos en la zona de inflamación y fagocitan las partículas de LDLox del medio transformándose en células espumosas (Hansson and Hermansson, 2011). Estudios recientes han mostrado una nueva visión en relación con la cinética de acumulación de macrófagos en placas de ateroma, demostrando que aunque el reclutamiento de monocitos circulantes es esencial para el desarrollo del ateroma, la proliferación de macrófagos residentes en la arteria contribuye en gran medida a la progresión de la lesión (Robbins et al., 2013). Además, se ha descrito que la población de macrófagos existente en las placas de aterosclerosis es relativamente heterogénea. Al menos dos fenotipos diferentes de macrófagos han sido descritos en aterosclerosis: pro-inflamatorios (o de fenotipo correspondiente a los activados por la vía clásica M1) y anti-inflamatorios o implicados en la resolución y reparación (de fenotipo correspondiente a los activados por la vía alternativa M2) (Gordon and Taylor, 2005). Los macrófagos M2, a diferencia de los M1, producen bajos niveles de citoquinas pro-inflamatorias y altos niveles de arginasa1 (Arg1), receptor de

manosa (Mrc1o CD206) e IL-10. Además, tienen alta capacidad fagocítica y menor capacidad de presentar antígeno que los macrófagos M1 (Gordon and Taylor, 2005). Estudios adicionales han demostrado la existencia de otros fenotipos de macrófagos en placas de ateroma, que no encajarían completamente ni dentro de la población de macrófagos activados por la vía clásica ni en los activados por la vía alternativa (Bouhlef et al., 2007; Khallou-Laschet et al., 2010; Mosser and Edwards, 2008).

A diferencia de lo que ocurre en otras patologías inflamatorias, en las que los macrófagos tienen la capacidad de abandonar la zona de inflamación después de fagocitar las partículas de desecho, en el caso de la aterosclerosis, las células espumosas cargadas con partículas de LDLox tienen un fenotipo más sénil y quedan retenidas en la lesión (Angeli et al., 2004; Randolph, 2008). La retención de células espumosas cargadas con LDLox causa expansión de la placa, además de aumento de la producción de citoquinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos) o G-CSF (factor estimulador de colonia de granulocitos), que entre otras consecuencias causan reclutamiento de más leucocitos y migración de CMLVs (Montezano et al., 2014). La progresión de la lesión continúa con la acumulación de lípidos extracelulares y de cristales de colesterol y la inducción masiva de apoptosis de las células inmunes y de músculo liso acumuladas en la zona central de la lesión, formando lo que se denomina el núcleo necrótico o núcleo lipídico (Hansson and Hermansson, 2011). Según progresa la lesión, el tamaño del núcleo necrótico aumenta, se desestabiliza la cápsula fibrosa que recubría la placa y acaba rompiéndose y dando lugar a la formación del trombo, que podría obstruir la circulación de la sangre. Según la zona afectada por la falta de riego se podrían desencadenar la angina de pecho, el infarto de miocardio e incluso la muerte repentina (Libby, 2002).

2.3. Tratamiento y modelos de estudio de las patologías de remodelado vascular.

El tratamiento de la hiperplasia o de la estenosis del vaso es controlado clínicamente mediante la implantación de un stent en el interior del conducto arterial obstruido, evitando el colapso del vaso (Iakovou et al., 2005a). Frecuentemente, los stents están preparados para liberar una serie de fármacos con capacidad anti-proliferativa e inmunosupresora con el fin de prevenir la restenosis de la arteria donde habían sido colocados. Aunque la utilización de stents ha permitido reducir el porcentaje de restenosis post-angioplastia, no ha permitido suprimirla en su totalidad. En el caso del desarrollo de AAA y de la aterosclerosis, el control farmacológico de factores de riesgo permite en gran parte ralentizar el crecimiento de las lesiones (Chaikof et al., 2009). Sin embargo, aunque estas enfermedades pueden ser tratadas a término, no existen tratamientos preventivos para restenosis o pequeños aneurismas que permitan de manera temprana solucionar y erradicar el

problema, limitando la expansión de los AAA y suprimiendo la restenosis en su totalidad. Por lo tanto, el estudio e identificación de moléculas involucradas en este remodelado vascular podría permitir el desarrollo de terapias encaminadas a tratar estas patologías en estadios tempranos. Actualmente existen modelos animales que mimetizan el desarrollo de estas patologías para su estudio. Así, se han desarrollado modelos de formación de neoíntima en conejos y ratones que consisten en la denudación de una arteria (carótida o femoral) por introducción de un catéter para mimetizar lo que ocurre en humanos (Roque et al., 2000). Para el estudio de los mecanismos implicados en el desarrollo de aneurismas se usa normalmente un modelo de infusión de AngII durante 28 días en animales deficientes para la proteína apolipoproteína E (*Apoe*^{-/-}) descrito por Alan Daugherty en el año 2000, aunque también se utiliza un modelo de infusión de elastasa (Anidjar et al., 1990). Además, el ratón *Apoe*^{-/-} también se utiliza como modelo de desarrollo de placas de ateroma, ya que muestra predisposición a sufrir hiperlipidemia y, como consecuencia, desarrollo espontáneo de aterosclerosis (Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992). Aunque estos animales desarrollan espontáneamente aterosclerosis, la aparición de estas lesiones se ve acelerada cuando son alimentados con dietas ricas en colesterol. Al igual que en la forma de aterosclerosis humana denominada hipercolesterolemia familiar, estos ratones muestran placas de ateroma principalmente en la zona de la aorta ascendente y en las válvulas aórticas (Getz and Reardon, 2012).

3. Ruta Calcineurina /NFAT

La ruta de señalización Calcineurina (CN)/NFAT está implicada en muchos procesos fisiológicos, entre los que se incluyen el desarrollo del sistema vascular (Graef et al., 2001; Molkentin et al., 1998) y nervioso (Graef et al., 2003), la condrogénesis (Ranger et al., 2000) y osteoclastogénesis (Aliprantis et al., 2008), la obesidad, la diabetes, y la hipertrofia cardíaca (Aramburu et al., 2004; Heit et al., 2006; Molkentin et al., 1998). La CN es una serín-treonín fosfatasa de estructura heterodimérica formada por una subunidad catalítica, CnA, y una subunidad reguladora, CnB, (Aramburu et al., 2000). El sustrato mejor caracterizado de esta fosfatasa es la familia de factores de transcripción NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*). Esta familia se compone de 4 miembros (NFATc1, NFATc2, NFATc3, y NFATc4) (Rao et al., 1997), los cuales son regulados por calcio y CN. En células en reposo, NFATc1-c4 se encuentran altamente fosforilados en el citoplasma. Cuando la célula recibe estímulos que provocan un aumento de calcio intracelular, la fosfatasa CN se activa y desfosforila serinas presentes en la región reguladora de NFAT (NHR) (Okamura et al., 2000). Como consecuencia, NFAT se trasloca rápidamente al núcleo celular donde interacciona con secuencias de ADN específicas (Hogan et al., 2003), regulando la transcripción de determinados genes diana, entre ellos numerosas citoquinas esenciales para la respuesta inmune e inflamatoria (Macian,

2005), así como la de otros genes importantes implicados por ejemplo en procesos de angiogénesis, como la ciclooxygenasa 2 (COX2) (Alfranca et al., 2006; Iniguez et al., 2003) o el regulador de calcineurina 1 (Rcan1) (Minami et al., 2004; Yao and Duh, 2004) (Fig. 6).

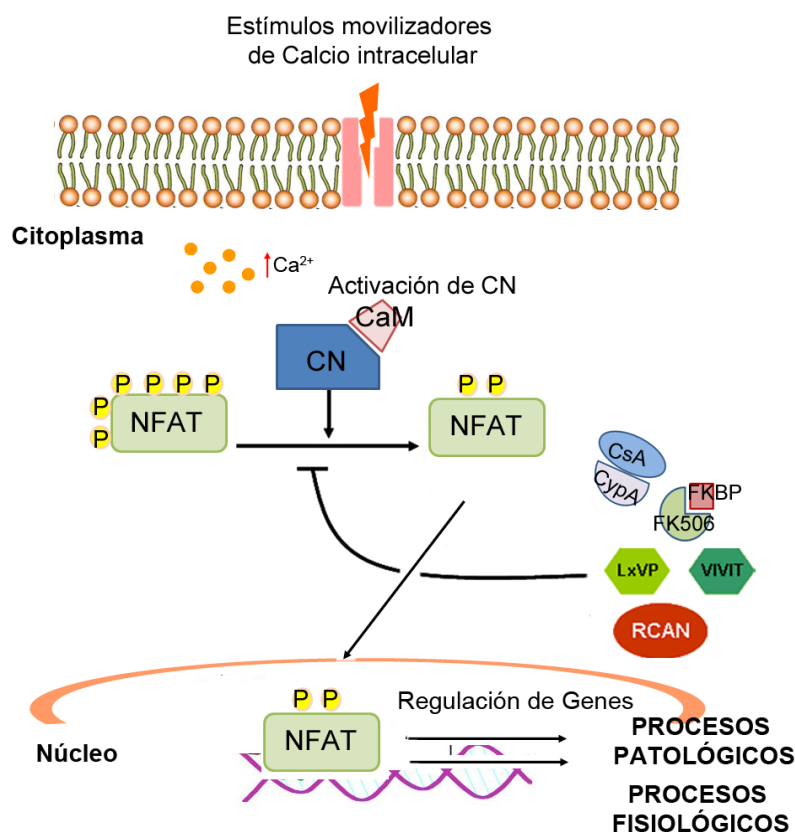


Figura 6. Esquema básico de la ruta de señalización CN/NFAT. El tratamiento de las células con estímulos que movilizan calcio intracelular provoca un aumento de la concentración de iones de Ca^{2+} en el citosol. Estos se unen a la calmodulina (CaM) permitiendo que ésta interaccione con la fosfatasa CN. El resultado de esta interacción provoca un cambio conformacional en CN que conlleva su activación. Cuando la célula está en reposo, los factores NFAT se encuentran en estado hiperfosforilado en el citosol, pero cuando la CN es activada desfosforila a NFAT, que expone su secuencia NLS, provocando su translocación al núcleo. Una vez en el núcleo, NFAT interacciona con su secuencia consenso (GGAAAA) presente en los promotores de sus genes diana. Cuando los niveles de Ca^{2+} intracelular vuelven a valores normales, quinasas nucleares fosforilan a NFAT permitiendo su exportación al citoplasma. La actividad de la CN está regulada por varios inhibidores endógenos (RCAN1, por ejemplo) y se puede inhibir mediante la administración de fármacos como la CsA y FK506 o mediante la expresión de secuencias consenso LxVP y VIVIT.

3.1. Inhibidores de CN

3.1.1. Farmacológicos: Ciclosporina A y FK506

Tanto Ciclosporina A (CsA) como FK506 son fármacos inmunosupresores que inhiben a CN. Estas dos moléculas interaccionan dentro de la célula con proteínas de la familia de las inmunofilinas: Ciclofilinas (CypA) y FKBP, respectivamente (Liu et al., 1991). El complejo

fármaco-inmunofilina es el que interacciona con CN e inhibe su actividad (Cardenas et al., 1995; Liu et al., 1991; Rodriguez et al., 2009). El tratamiento de las células con estos fármacos inhibe la translocación de NFAT al núcleo y la consecuente regulación transcripcional de sus genes diana. Aunque estos dos fármacos se utilizan en pacientes trasplantados como tratamiento para evitar el rechazo inmunológico del injerto, su administración a largo plazo produce numerosos efectos secundarios como toxicidad en hígado, riñón y sistema nervioso; enfermedades cardiovasculares; disfunción renal y neoplasias (Kiani et al., 2000). El origen de los efectos secundarios derivados del tratamiento con estos inmunosupresores puede ser debido a una acción dependiente o independiente de su efecto sobre CN, ya que estas drogas pueden afectar a otras vías de señalización, así como interferir con las inmunofilinas a las que se unen y con su actividad propil-isomerasa (Kiani et al., 2000; Martinez-Martinez and Redondo, 2004; Matsuda et al., 2000).

En relación con el estudio del papel de la ruta CN/NFAT en modelos de enfermedades vasculares, existen en la literatura resultados contradictorios. En el modelo de aterosclerosis, algunos estudios proponen un papel pro-aterogénico de la CypA mediado por el aumento de la captación de moléculas de LDL, inducción de la inflamación e incremento de la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales (Nigro et al., 2010). En cambio, otros estudios muestran que el tratamiento con CsA inhibe la proliferación y migración de CMLVs tanto *in vitro* como *in vivo*, sugiriendo que CsA podría tener un papel anti-aterogénico (Kockx et al., 2010). En el caso de FK506, se ha observado que el tratamiento a largo plazo va asociado con un alto riesgo de padecer aterosclerosis (Apanay et al., 1994). Sin embargo, estudios más recientes en ratones *Apoe*^{-/-} muestran que el tratamiento con dosis más bajas de FK506 inhibe la progresión de la aterosclerosis y aumenta la estabilización de las placas en estos ratones (Donners et al., 2005). Por otra parte, la ruta CN/NFAT también ha sido implicada en procesos de crecimiento de neoíntima en modelos de daño arterial en carótida y femoral, mostrando que la inhibición de CN por CsA reduce la formación de neoíntima en respuesta a denudación endotelial en esta patología (Andersen et al., 1999; Liu et al., 2005; Satonaka et al., 2004). En modelos de desarrollo de aneurismas en rata se ha descrito que la administración de CsA o el tratamiento con FK506 disminuyen la dilatación aórtica generada por infusión de elastasa (Dobrin et al., 1996; Yamaguchi et al., 2000). Sin embargo, estudios en pacientes trasplantados tratados a largo plazo con terapias inmunosupresoras con CsA, han mostrado que este tratamiento podía generar efectos secundarios como desarrollo de AAA (Reichman et al., 1990).

A pesar de la importancia de la ruta CN/NFAT en el remodelado patológico de la pared vascular y de la relevancia de AngII en estos procesos de remodelado (Berk, 2001) y como activadora de la fosfatasa CN (Suzuki et al., 2002), en el momento de iniciar nuestros

estudios no existían trabajos concluyentes sobre el papel de AngII como regulador de la ruta CN/NFAT en CMLVs en la pared vascular.

3.1.2. Peptídicos: VIVIT y LxVP

Debido a los efectos secundarios derivados del tratamiento con estos inmunosupresores, se han llevado a cabo estudios enfocados en encontrar moléculas capaces de inhibir selectivamente CN. Algunos de estos trabajos se han basado en el uso de las secuencias de interacción de NFAT con CN. De esta forma, se han descrito dos motivos de interacción en NFAT: uno en la región N-terminal (PxIxIT) (Aramburu et al., 1998) y otro en la C-terminal (LxVP) (Liu et al., 1999; Martinez-Martinez et al., 2006; Park et al., 2000). El descubrimiento de estos dos dominios de unión permitió utilizar secuencias peptídicas específicas capaces de bloquear la interacción de CN con NFAT. Así, tenemos el péptido VIVIT basado en la secuencia PxIxIT (Aramburu et al., 1999), que bloquea la interacción de NFAT con CN, y el péptido LxVP, que actúa bloqueando dicha interacción y además, a diferencia del péptido VIVIT, inhibiendo la actividad fosfatasa de CN (Martinez-Martinez et al., 2006; Rodriguez et al., 2009). El efecto beneficioso de la inhibición de la ruta CN/NFAT *in vivo* mediante la expresión del péptido VIVIT ha sido descrita en un modelo de restenosis (Liu et al., 2005), en hipertrofia cardíaca (Kuriyama et al., 2006) y en aterosclerosis (Yu et al., 2006).

3.1.3. Proteínas endógenas

La actividad de CN también está regulada, entre otros mecanismos, por su interacción con proteínas endógenas reguladoras o de anclaje (Martinez-Martinez and Redondo, 2004), entre las que podemos destacar:

Cabin1 (proteína de unión a CN 1): es una fosfoproteína de expresión ubicua (Sun et al., 1998). Presenta un dominio similar al PxIxIT de NFAT y es capaz de inhibir la actividad CN (Martinez-Martinez et al., 2009). Por ejemplo, se ha descrito el papel de Cabin1 como inhibidor de la actividad CN durante la activación de linfocitos T (Liu, 2003).

AKAP79 (proteína quinasa A de anclaje): es una proteína que puede encontrarse asociada a CN, y a la subunidad reguladora de las proteínas quinasas A (PKA) y C (PKC) (Dell'Acqua et al., 1998; Faux et al., 1999; Klauck et al., 1996). Al igual que Cabin1, presenta un dominio similar al PxIxIT de NFAT por el cual inhibe la interacción de CN con sus sustratos (Dell'Acqua et al., 2002).

RCAN (Regulador de CN): Es la familia más importante de reguladores de CN.

4. Regulador de Calcineurina (RCAN)

La familia de proteínas RCAN, también conocidas en mamíferos como DSCR/MCIP/calpinesina(CALP)/Adapt78 (Davies et al., 2007), ha sido la más estudiada entre las proteínas reguladoras de CN. Esta familia comprende 3 miembros (RCAN1-3) en vertebrados, codificados por 3 genes diferentes (Fuentes et al., 1997), mientras que sólo cuenta con un miembro, denominado Rcn1, en protozoos, hongos e invertebrados (Kingsbury and Cunningham, 2000). La familia RCAN fue identificada en hongos en estudios enfocados a describir las proteínas de unión a CN (Gorlach et al., 2000) y las proteínas inhibidoras de CN (Kingsbury and Cunningham, 2000). En mamíferos, RCAN fue descrito en un estudio comparativo que pretendía identificar genes compartidos entre el genoma de levaduras y humanos (Fuentes et al., 1997).

Los miembros de RCAN en vertebrados se caracterizan por presentar varios motivos conservados en su estructura proteica (Mulero et al., 2009). Las regiones de mayor conservación aminoacídica se encuentran principalmente en las regiones central y C-terminal (Aubareda et al., 2006; Davies et al., 2007). Estudios sistemáticos usando mutantes truncados de RCAN han descrito que esta proteína presenta varias regiones de unión y regulación de CN (Aubareda et al., 2006; Chan et al., 2005; Kingsbury and Cunningham, 2000; Mehta et al., 2009; Mulero et al., 2007; Vega et al., 2002). Sin embargo, la región C-terminal de RCAN1 es suficiente para unir CN e inhibir su actividad fosfatasa (Martinez-Martinez et al., 2009). Recientemente, se ha descrito que la secuencia PSVVVH presente en el dominio CIC de la región C-terminal de RCANs es capaz de competir con el péptido VIVIT por su unión con CN (Martinez-Martinez et al., 2009; Mehta et al., 2009). Esta secuencia PSVVVH es similar al sitio PxIXIT de NFAT y es necesaria para la unión de RCAN a CN (Martinez-Martinez et al., 2009; Mehta et al., 2009; Mulero et al., 2009). Por otra parte, se ha descrito la presencia de una secuencia LXXP en Rcn1 de levaduras, cercana a la región central, que también está implicada en la unión a CN y que, como el dominio LxVP de NFAT, inhibe la actividad fosfatasa de CN (Mehta et al., 2009). Por lo tanto, parece que RCAN podría regular CN mediante dos mecanismos de actuación: competición por la interacción con otros sustratos de la CN y regulación de la actividad fosfatasa (Martinez-Martinez et al., 2009).

4.1. RCAN1 (Regulador de Calcineurina 1)

RCAN1 (*Regulator of Calcineurin 1*), inicialmente denominado DSCR1 (*Down Syndrome Critical region 1*) es el miembro más abundante y mejor caracterizado hasta el momento de la familia RCAN. La proteína se encuentra altamente conservada en la evolución,

presentando un 96% de homología entre humanos y ratones (Strippoli et al., 2000), lo que sugiere su importancia biológica. *RCAN1* fue identificado en humanos por su asociación con el Síndrome de Down o trisomía del cromosoma 21, ya que se localiza en el brazo largo región q22.12 de este cromosoma (Fuentes et al., 1997), lo que conlleva su sobreexpresión en estos individuos (Fuentes et al., 2000). En el caso de ratones, *Rcan1* se localiza en el cromosoma 16 y también se observa que su trisomía en un modelo de ratón modificado genéticamente (ratón Ts65Dn) presenta un desequilibrio de dosis génica que produce un fenotipo que podría ser similar al observado en humanos (Reeves et al., 1995). La expresión de *RCAN1* muestra una distribución tejido específica en ratón similar a lo que se observa en humanos, siendo corazón, cerebro, músculo esquelético e hígado los tejidos con mayor expresión de este gen, descritos hasta el momento (Casas et al., 2001; Fuentes et al., 1995).

4.2. Isoformas de *RCAN1*

El gen *RCAN1* contiene siete exones (Fig. 7) y puede transcribir 4 isoformas diferentes, *RCAN1-1*, *1-2*, *1-3*, y *RCAN1-4*, mediante la activación alternativa de promotores y el uso alternativo de los exones 1-4 como primer exón (Fuentes et al., 1997). A nivel de proteína, solo se han detectado y estudiado *RCAN1-1* (DSCR-1L) y *RCAN1-4* (DSCR-1s) en humanos y en ratones (Davies et al., 2007). El exón 2 carece de una metionina de inicio y el exón 3 solo podría codificar para 3 aminoácidos (Fuentes et al., 1997). *RCAN1-1* está codificada por los exones 1, 5, 6 y 7 y *RCAN1-4* lo está por los exones 4, 5, 6 y 7 (Fuentes et al., 1997). La transcripción de la isoforma *RCAN1-1* está controlada por un promotor ubicado delante del exón 1, mientras que la de *RCAN1-4* lo está por un promotor interno localizado en el intrón 3 (Fig. 7). Estas isoformas, además de presentar diferentes patrones de expresión, tienen diferente mecanismo de regulación de su expresión. Así, mientras que *RCAN1-1* se expresa habitualmente de forma constitutiva en los tejidos, la transcripción de la isoforma *RCAN1-4* es inducida *de novo* por

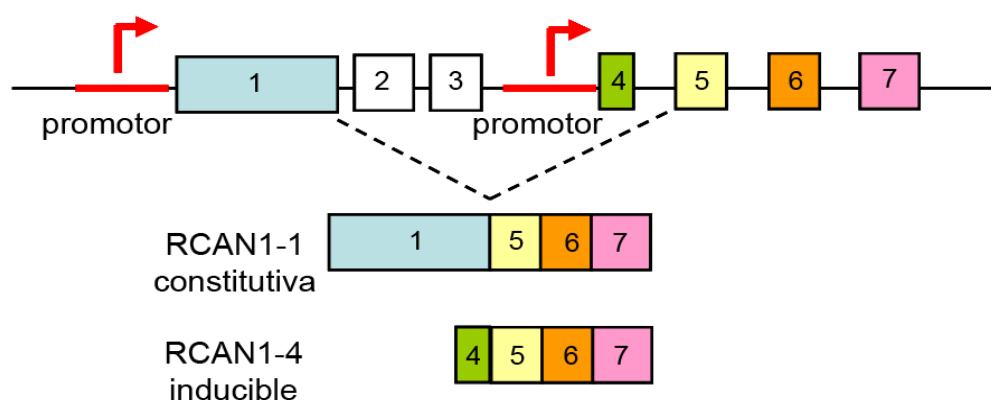


Figura 7. Diagrama esquemático de la estructura del gen *RCAN1* y de sus isoformas. Se muestran las dos isoformas *RCAN1-1* (exones 1, 5, 6 y 7) y *RCAN1-4* (exones 4, 5, 6 y 7). Las líneas rojas muestran la localización de los promotores, y la línea punteada el splicing entre los exones 1 y 5.

estímulos movilizadores de calcio intracelular capaces de activar la ruta CN/NFAT (Cano et al., 2005; Crawford et al., 1997; Ermak et al., 2002; Minami et al., 2004; Wang et al., 2002; Yang et al., 2000). De hecho, el promotor de *RCAN1-4* contiene al menos 15 sitios de unión a NFAT, mientras que el promotor de *RCAN1-1* no parece contener ninguno (Yang et al., 2000).

4.3. Regulación de CN mediada por RCAN

El hecho de que la expresión de la isoforma *RCAN1-4* sea activada por CN ha sido interpretado como un mecanismo de autorregulación (retroalimentación negativa) de la propia ruta de señalización CN/NFAT, ya que la activación de CN provoca un aumento de la expresión de su propio regulador endógeno *RCAN1-4* (Wu et al., 2007; Yang et al., 2000). Las evidencias de que *RCAN1* se une a CN y actúa como inhibidor proceden principalmente de ensayos en los que *RCAN1* es sobreexpresado *in vitro* (Fuentes et al., 2000; Hilioti and Cunningham, 2003; Kingsbury and Cunningham, 2000; Rothermel et al., 2000). Sin embargo, el estudio de modelos animales de deficiencia o sobreexpresión de *Rcan1* generó un amplio debate sobre el papel inhibidor o activador de éste, debido a que se obtuvieron datos experimentales que describían su participación tanto en la inhibición como en la activación de la ruta CN/NFAT (Hoeffler et al., 2007; Ryeom et al., 2008; Ryeom et al., 2003; Vega et al., 2003b). Diversos estudios bioquímicos sugieren que *RCAN1* está expuesto a modificaciones post-traduccionales, como pueden ser la fosforilación y la ubiquitinación, y que estas modificaciones pueden determinar el efecto de *RCAN1* sobre la señalización de CN/NFAT. En este sentido, se ha descrito que la fosforilación de *RCAN1* por parte de GSK3 (Hilioti et al., 2004), TAK1 (Liu et al., 2009) o BMK-1 (Abbasi et al., 2006) convierte a *RCAN1* en un activador de la ruta de CN. Mientras, la fosforilación en otros residuos de serina parece aumentar su estabilidad y el efecto inhibidor que *RCAN1* ejerce sobre CN (Genesca et al., 2003), como es el caso de la fosforilación de su región C-terminal por la quinasa inductora de NF- κ B (NIK) (Lee et al., 2008). Asimismo, también ha sido descrita la ubiquitinación de *RCAN1-1*, lo que le convertiría en un sustrato más susceptible a degradación por parte del proteasoma y eventualmente permitiría amplificar la señalización de NFAT (Asada et al., 2008). Sin embargo, aunque la regulación post-traduccional de *RCAN1* podría servir como potencial mecanismo para explicar la regulación diferencial que ejerce sobre CN, serían necesarios estudios adicionales que clarifiquen los mecanismos encargados de este papel dual de *RCAN1*.

4.4. RCAN1 y enfermedades

Como hemos dicho anteriormente, *RCAN1* fue identificado por su asociación con el síndrome de Down en humanos y posteriormente ha sido implicado en otros procesos fisiológicos y patológicos, entre los que se incluyen crecimiento tumoral (Ryeom et al., 2008), angiogénesis

(Baek et al., 2009), sepsis (Minami et al., 2009), hipertrofia cardiaca (Rothermel et al., 2001; Vega et al., 2003a), función de mastocitos (Yang et al., 2009), y plasticidad sináptica y memoria (Hoeffler et al., 2007). Sin embargo, aunque en el sistema cardiovascular se ha estudiado el papel de Rcan1 en hipertrofia cardiaca, no existía ningún estudio del papel de esta proteína en el desarrollo de los procesos patofisiológicos de la pared vascular.

En pacientes con Alzheimer se ha descrito que la expresión de RCAN1 está aumentada en cerebro (Ermak et al., 2001) y que los niveles de actividad CN están disminuidos (Ladner et al., 1996). La baja actividad CN que se detecta en estos pacientes permite la hiperfosforilación de la proteína Tau y la formación de ovillos neurofibrilares responsables de la degeneración cerebral en la enfermedad (Ermak et al., 2001). En el caso del síndrome de Down también hay una alteración de los niveles de RCAN1 en cerebro (Porta et al., 2007). Estos pacientes exhiben neuropatologías con características parecidas a los pacientes con Alzheimer, así como defectos cardiacos y disfunciones inmunológicas (Harris et al., 2005); estas dos últimas asociadas también a un papel por parte de RCAN1. Sin embargo, estos pacientes presentan una menor incidencia de tumores, desarrollo de aterosclerosis y disfunción renal (Minami, 2014). Estudios comportamentales en ratones que sobreexpresan Rcan1 han mostrado que estos ratones presentan menor capacidad de aprendizaje (Dierssen et al., 2011). Se ha descrito que Rcan1 facilita la plasticidad sináptica vía inhibición de CN, lo que supuso el pensar en Rcan1 como una posible terapia para el tratamiento de desórdenes neurológicos (Hoeffler et al., 2007).

En relación con el papel de Rcan1 en hipertrofia cardiaca se ha observado que animales transgénicos que sobreexpresan Rcan1 específicamente en el corazón muestran disminución de la hipertrofia cardiaca en el modelo de hipertrofia ventricular por sobreexpresión constitutiva de CnA en el miocardio (ratones α -MHC-CnA) (Rothermel et al., 2001) y en los modelos de hipertrofia por estimulación de receptores β -adrenérgicos o por ejercicio (Hill et al., 2002; Rothermel et al., 2001). Asimismo, los ratones que sobreexpresan Rcan1 presentan mejora de la función cardiaca comparados con los animales silvestres en un modelo de infarto de miocardio (van Rooij et al., 2004). Mientras, animales deficientes para Rcan1 (*Rcan1*^{-/-}) en el mismo modelo genético de α -MHC-CnA muestran reacciones hipertróficas exacerbadas con severos signos de fibrosis (Vega et al., 2003b). Sin embargo, cuando la hipertrofia es inducida por estimulación crónica de receptores β -adrenérgicos o por constricción aórtica la deficiencia de Rcan1 reduce el desarrollo de hipertrofia (Sanna et al., 2006; Vega et al., 2003a). Por lo tanto, se ha sugerido que Rcan1 puede jugar papeles duales en hipertrofia cardiaca potenciándola o suprimiéndola, dependiendo de la naturaleza del daño (*strength*) y del estímulo hipertrófico utilizado (Vega et al., 2003).

Rcan1 también ha sido estudiado en el desarrollo de tumores por su capacidad reguladora de la angiogénesis. Así, se ha descrito que la actividad calcineurina está muy incrementada

en células endoteliales de ratones *Rcan1*^{-/-} y que esta podría ser la causa de la inducción de la apoptosis de estas células, y de la consecuente inhibición de la angiogénesis y del crecimiento tumoral (Ryeom et al., 2008). Sin embargo, en modelos de ratones Ts65Dn que mimetizan la trisomía del cromosoma 21 humano, el aumento de los niveles de Rcan1 disminuye el crecimiento tumoral debido a un defecto en angiogénesis atribuido a la inhibición de la ruta CN/NFAT (Baek et al., 2009). La migración de las células endoteliales desempeña un papel central durante la angiogénesis. Aunque ha habido numerosos estudios del papel de Rcan1 en la regulación de la migración celular, los resultados publicados resultan relativamente contradictorios. Así, en células endoteliales, Rcan1 inhibe la migración inducida por VEGF y la formación de tubos *in vitro* (Iizuka et al., 2004; Minami et al., 2004). Asimismo, su silenciamiento (knockdown) en líneas celulares tumorales incrementa su movilidad, mientras que su sobreexpresión reduce tanto la movilidad como la actividad CN (Espinosa et al., 2009). Mediante ensayos de sobreexpresión y silenciamiento selectivo *in vitro*, se ha propuesto que la isoforma RCAN1-1 induce la angiogénesis mientras que la isoforma RCAN1-4, inducible y dependiente de NFAT, la inhibe (Qin et al., 2006). Sin embargo, este papel diferencial de las isoformas de RCAN1 no ha sido demostrado *in vivo*. En definitiva, parece que Rcan1 podría desempeñar papeles opuestos en migración celular en función del escenario de actuación, de la concentración intracelular de la proteína (Shin et al., 2011), de la isoforma y/o de su actuación sobre CN.

Pero sin duda, el papel de Rcan1 en la respuesta inmune e inflamatoria ha sido el más estudiado debido a que ha sido descrito como mediador de las inmunodeficiencias encontradas en los pacientes de síndrome de Down (Goldacre et al., 2004). En este sentido, Rcan1 es importante en la producción y maduración de eosinófilos ya que se ha observado que animales *Rcan1*^{-/-} presentan, tanto en condiciones basales como en un modelo de asma, menos progenitores de eosinófilos en la médula ósea (Yang et al., 2009; Yang et al., 2011). Además, se ha observado que Rcan1 es importante en la regulación de la respuesta alérgica, tanto *in vivo* como *in vitro*, en su papel como regulador de la degranulación de los mastocitos (Yang et al., 2009). También se ha descrito su papel en la respuesta inmune adaptativa *in vivo* como regulador de la activación y supervivencia de linfocitos T, observándose que animales deficientes en Rcan1 presentan más apoptosis de células T (Ryeom et al., 2003; Sanna et al., 2006). Además, estudios posteriores también mostraron la implicación de Rcan1 en la respuesta inmune innata, ya que se le ha relacionado con la regulación de la producción de citoquinas inflamatorias en macrófagos en respuesta a diferentes estímulos inmunológicos (Bhoiwalla et al., 2011). Asimismo, la deficiencia de Rcan1 en modelos de infección respiratoria da lugar a una mayor mortalidad debido a un aumento del reclutamiento de neutrófilos y de citoquinas inflamatorias, lo que sugería que Rcan1 actuaba como regulador negativo de la inflamación durante los procesos de infección respiratoria (Junkins et al., 2013).

A microscopic image of tissue, likely a histological section, showing various cellular structures and staining. The tissue is stained with a combination of red and blue dyes, highlighting different components. The red staining is prominent in the lower right quadrant, while the blue staining is more widespread. The overall texture is granular and complex, typical of biological tissue at the cellular level.

OBJETIVOS

A pesar de la importancia que AngII y la migración de CMLVs tienen en los procesos de remodelado vascular, la información descrita acerca de las rutas de señalización que median estos procesos era escasa. La ruta de señalización CN/NFAT se ha asociado a procesos tanto fisiológicos como patológicos, y se ha descrito que puede ser activada por AngII en algunos tipos celulares. Sin embargo, al inicio de este trabajo no existía información, que relacionara a la ruta CN/NFAT con el remodelado patológico de la pared vascular inducido por AngII.

El objetivo primordial de esta tesis fue estudiar el papel de la ruta CN/NFAT en los procesos de remodelado vascular patológico, e identificar los posibles genes diana regulados por esta ruta.

Los objetivos concretos fueron:

- Estudiar si la ruta CN/NFAT se activa por AngII en CMLVs y evaluar su implicación en la migración de estas células, y en el remodelado vascular en modelos de aneurisma abdominal aórtico (AAA) y formación de neointima.
- Investigar el mecanismo por el cual la ruta CN/NFAT media los procesos de migración en CMLVs y el daño vascular inducido por AngII.
- Determinar la contribución de Rcan1 como mediador de la migración de CMLVs, y su papel en modelos de remodelado vascular patológico, inducidos por AngII.
- Evaluar la contribución de Rcan1 al desarrollo de aterosclerosis.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Los ratones C57BL/6 *Rcan1*^{-/-} utilizados fueron previamente descritos por Porta et al 2007. En ellos se delectona de forma constitutiva la expresión de ambas isoformas *Rcan1*-1 y *Rcan1*-4 por medio de la interrupción de la expresión del gen en el exón 6, común a ambas isoformas. Los ratones dobles negativos *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} fueron generados cruzando los animales *Apoe*^{-/-} (Charles River) con los ratones *Rcan1*^{-/-}.

Todos los animales fueron genotipados mediante PCR usando muestras de ADN genómico obtenidas de cola. Para ello se utilizaron las siguientes sondas:

Para <i>Rcan1</i>	5´-GGTGGTCCACGTGTGTGAGA-3´ 5´-ACGTGAACAAAGGCTGGTCCT-3´
Para <i>Apoe</i>	5´-TGTCTTCCACTATTGGCTCG-3´ 5´-TGGCGGACCGCTATCAGGAC-3´

Todos los ratones se mantuvieron en las instalaciones del CNIC en un ambiente libre de patógenos, con ciclos de luz y oscuridad, temperatura y humedad regulados según la normativa europea para el cuidado animal (EU Directive 2010/63EU and Recommendation 2007/526/EC).

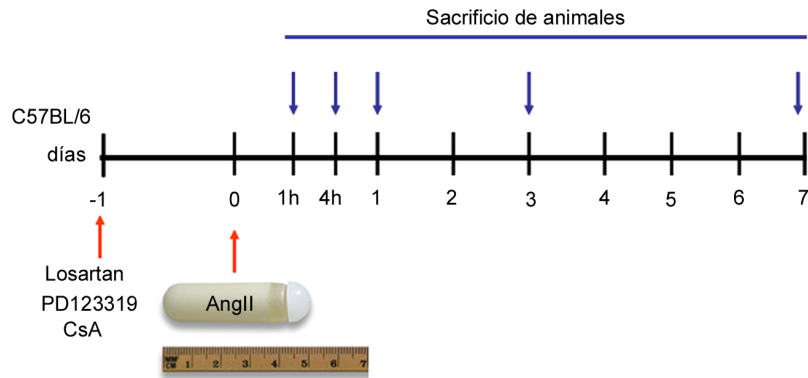
2. Procedimientos en animales

2.1. Modelo de infusión de AngII en ratón

El estudio del efecto directo de AngII *in vivo* se realizó mediante la infusión sistémica con minibombas osmóticas subcutáneas (Alza Corp., Cupertino, CA., USA) de AngII (Sigma/ Aldrich) a una dosis de 1 µg/kg/min durante tiempos establecidos. Los animales usados fueron ratones de fondo silvestre (C57BL/6) de Charles River. Estos animales fueron anestesiados con Ketamina / Silacina (1.5 ml de ketamina y 0.5 ml de Silacina en 10 ml de suero salino) y en ellos se realizó una incisión superficial en la parte dorsal donde se implantó de forma subcutánea la minibomba. Posteriormente, la herida fue cerrada con sutura. Después de los tiempos establecidos (1h, 3h, 1d, 4d y 7d) los animales fueron sacrificados (n = 4-8 animales por grupo). Para determinar el papel de los receptores de AngII se implantaron minibombas para la infusión del antagonista del receptor AT₁, Losartan (Fluka) a 10 mg/Kg/d, o del antagonista del receptor AT₂ PD123319 (Sigma-Aldrich) a 30 mg/kg/d, empezando con el tratamiento 24 horas antes de la infusión de AngII. Para la inhibición de CN también se implantaron minibombas de infusión de CsA a 5 mg/kg/d (Sandimmun; Novartis) también 24h antes de la infusión de AngII (Fig. 8).

Figura 8. Esquema del modelo de infusión de AngII en ratón.

Se indican los tiempos de comienzo de infusión de los diferentes tratamientos (flechas rojas) y los diferentes tiempos de sacrificio de los ratones (flechas azules). La regla muestra el tamaño de las minibombas empleadas.



2.2. Modelo de desarrollo de Aneurisma Abdominal Aórtico en ratones *Apoe*^{-/-} por infusión de AngII

Se utilizaron animales modificados genéticamente deficientes en la apolipoproteína E (*Apoe*^{-/-}) de 2 meses de edad. Los animales fueron anestesiados y las minibombas de AngII fueron implantadas subcutáneamente. La AngII se administró en una concentración de 1 µg/kg/min durante 28 días como fue descrito anteriormente (Daugherty et al., 2000). La CsA fue administrada a una concentración de 5 mg/Kg/d mediante minibombas osmóticas implantadas 24h antes de la implantación de las bombas de AngII, y mantenidas durante los 28 días de tratamiento. Los animales control fueron infundidos con salino. El diámetro aórtico abdominal fue monitorizado a 0 y tras 3, 7, 14, 21 y 28 días de tratamiento mediante ultrasonidos de alta frecuencia con el sistema VEVO770, con un protocolo previamente descrito (Martin-McNulty et al., 2005) (Fig. 9). Las medidas de diámetro aórtico máximo se realizaron a nivel de la aorta suprarrenal.

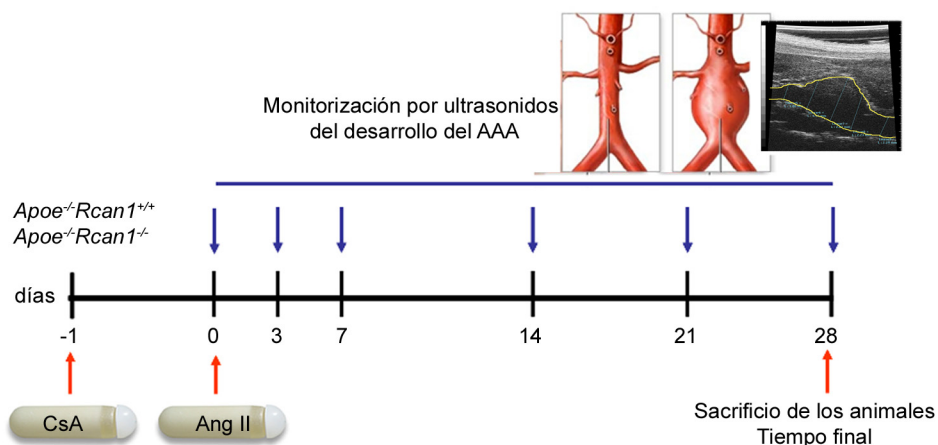


Figura 9. Esquema del modelo de desarrollo de aneurisma abdominal aórtico (AAA) en ratón por infusión de AngII. Se indica los tiempos del comienzo de la infusión de los tratamientos (flechas rojas -1 y 0 días), los días de monitorización del diámetro aórtico mediante ecografía (flechas azules) y el tiempo de sacrificio de los ratones (flecha roja 28 días).

Las aortas suprarrenales con diámetro externo igual o superior a 1,5 mm fueron consideradas AAA. Los animales fueron sacrificados con CO₂ tras los 28 días de tratamiento y perfundidos con salino para la obtención de las aortas que posteriormente se procesaron como se explicará más adelante (apartado de Análisis Histológico).

2.3. Modelo de daño en arteria femoral

En este modelo se utilizaron ratones C57BL/6 silvestres y ratones *Rcan1*^{-/-}. Para el daño en arteria femoral se siguió el protocolo previamente descrito por Roque et al., 2000. Durante la operación, los animales fueron mantenidos bajo anestesia inhalada (isoflorano). Se realizó una pequeña incisión en la pata para abrir y exponer la arteria femoral. Ya que esta arteria se encuentra muy cercana a una vena y a un nervio, los primeros pasos consistieron en aislar la arteria cuidadosamente de estas dos estructuras sin dañar ninguna de ellas. Cuando la arteria ya está separada, se procede al clampaje de la arteria a nivel del ligamento inguinal para evitar el paso de flujo sanguíneo (Fig. 10, panel a). Posteriormente, se realizó una pequeña incisión en la arteria, por la que se introdujo en tres ocasiones un catéter (Advanced Cardiovascular System) de 0,25 mm de diámetro (Fig. 10, panel b). Tras sacar el catéter, se cerró la incisión con una seda (Fig. 10, panel c) y se selló la herida. Gracias a la presencia de otros vasos, como en este caso el brazo epigástrico, la pata se encuentra irrigada aunque se haya clampado el paso de sangre por la arteria femoral. El mismo protocolo se realizó en la otra pata del animal. En los animales controles (no dañados), se realizó la incisión y el clampaje pero no se causó el daño con el catéter. Minibombas de administración de AngII (0,5 µg/kg/min) fueron implantadas inmediatamente antes de la operación y se mantuvieron durante 14 días.

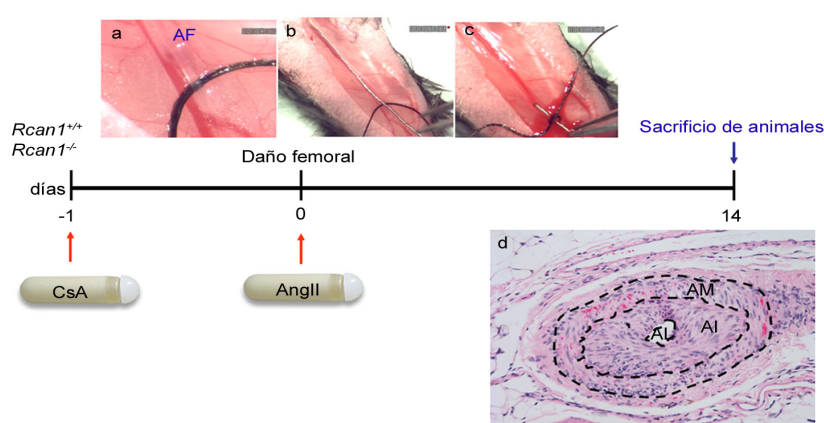


Figura 10. Esquema mostrando el modelo de daño en arteria femoral. Se indican el momento de comienzo de infusión de los estímulos (flechas rojas) y el tiempo de sacrificio de los animales (flecha azul). Los paneles a-c muestran distintos pasos de la cirugía: a) Aislamiento de la arteria femoral AF (Arteria femoral), b) introducción del catéter en la arteria y c) extracción del catéter y cierre de la arteria. El panel d muestra un ejemplo de corte histológico de una arteria lesionada y las diferentes partes de la lesión: AI, Área de la íntima; AM, Área de la media; AL, Área del lumen.

Las bombas de infusión de CsA (5 mg/Kg/d) fueron implantadas 24h antes de la operación y mantenidas también durante los 14 días. (Fig. 10). Trascurrido este tiempo, los animales fueron sacrificados y las arterias femorales fueron obtenidas y procesadas como se explica en el apartado de análisis histológico. Para el cálculo del grado de estenosis usamos la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Estenosis} = 100 \times [\text{Área íntima} / (\text{Área del lumen} + \text{Área de la íntima})]$$

Este procedimiento puede visualizarse en el Video 1 incluido en el CD que acompaña al ejemplar escrito de esta Tesis.

2.4. Modelo de aterosclerosis inducida por dieta grasa en ratones *Apoe*^{-/-}

Ratones *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} de 3 meses de edad fueron alimentados con dieta rica en grasa (10.8% grasa total, 0.75% colesterol; S4892-E010, Ssniff, Germany) durante 6 semanas (Fig. 11). Para analizar los parámetros bioquímicos se obtuvieron muestras de sangre de estos animales al inicio y al final de la dieta mediante pinchazo en el maxilar. Las concentraciones de; colesterol libre (CL), colesterol total (CT), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL) y triglicéridos (TGA) del plasma de estos animales fueron analizadas en ensayos enzimáticos usando el Kinetic colometric kit (Spinreact; Spain). Pasado el tiempo de dieta, los animales fueron sacrificados y tanto la aorta como el corazón fueron extraídos para su análisis (Fig. 11, paneles a y b).

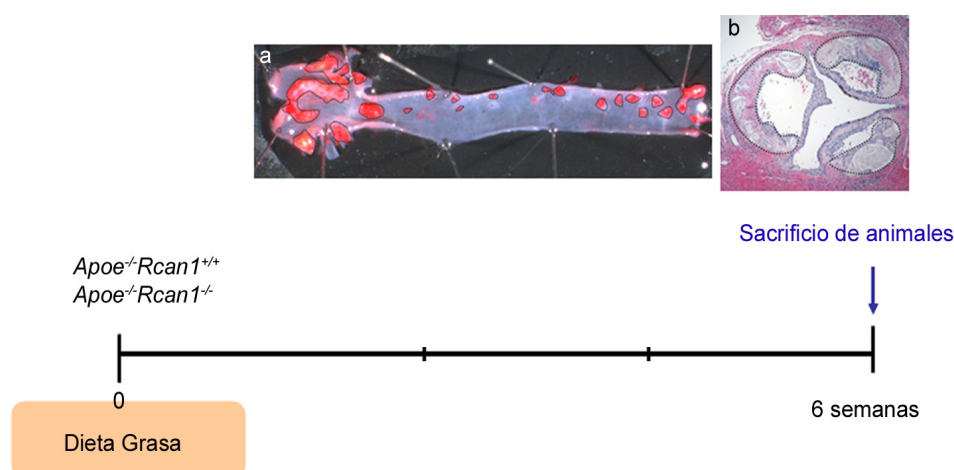


Figura 11. Esquema mostrando el modelo de aterosclerosis inducido por dieta grasa. Se indican los tiempos de sacrificio de los animales (flechas azules). Los paneles a y b muestran, respectivamente, ejemplos de análisis de la parte torácica de una aorta aislada de estos animales mediante tinción con Oil Red y de una sección de válvulas aórticas lesionadas teñidas con Hematoxilina Eosina.

2.5. Trasplante de médula ósea

Para el modelo de trasplante de médula ósea, las células del compartimento hematopoyético fueron obtenidas de tibias y fémures de donantes *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-} *Rcan1*^{-/-}. Para la extracción de estas células, los animales fueron sacrificados y las tibias y fémures aislados. Las células hematopoyéticas se extrajeron mediante inyecciones de medio en el lumen de estos huesos. Los eritrocitos presentes en esta solución de células fueron lisados en un buffer específico (1,5 M cloruro amónico 0,1 M bicarbonato potásico, 0,1 M EDTA) y las células restantes fueron resuspendidas en buffer fosfato salino 1x (PBS 1x) e inyectadas (10^7 en 300 μ l PBS) por vía intravenosa en la cola de animales *Apoe*^{-/-} previamente irradiados con una dosis letal de 9 Greys (Fig. 12). Para comprobar la implantación de las células trasplantadas, porcentajes de poblaciones celulares y de plaquetas circulantes en sangre fueron medidos e identificados usando el contador automático Petra Multi Link (Horiba). Para analizar el porcentaje de subpoblaciones de linfocitos en muestras de sangre, los eritrocitos fueron lisados con el buffer específico antes citado en hielo durante 3 min. La reacción se paró con PBS 1x suplementado con 1% de albumina de suero bovino (BSA) y las células fueron incubadas con CD45 PerCP-Cy5.5 (BDPharmigen 550994 leucocitos), B220 Biotin (BDPharmigen 559971 linfocitos B), CD3 AlexaFluor488 (BD Pharmigen 557666 linfocitos T), CD4 Pe (BD Pharmigen 553653) y CD8 AlexaFluor647 (BD Pharmigen 557682) durante 30 min en hielo. La estraptavidina 405 (Invitrogen, S-32351) se utilizó como reactivo secundario. El porcentaje de células fue analizado mediante citometría de flujo usando el citómetro BDFACS Canto II (BD Biosciences) y los datos fueron analizados con el software FlowJo (Tree Star).

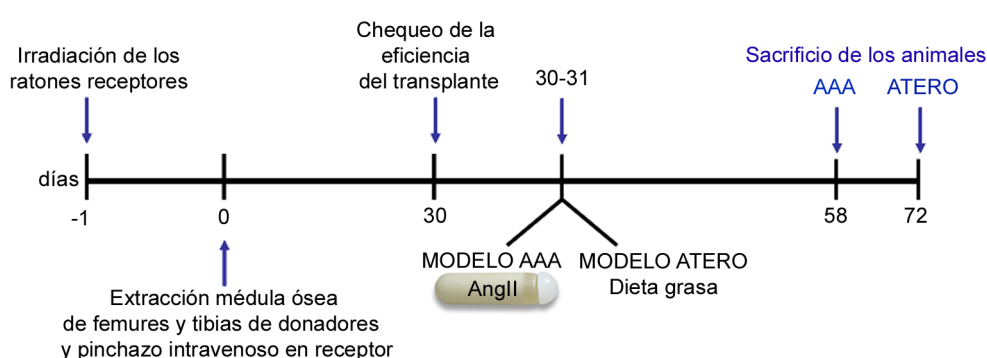


Figura 12. Esquema mostrando el protocolo de trasplante de médula ósea en el modelo de AAA y de aterosclerosis (ATERO). Se indican los días en los que se realizó la irradiación de los ratones (día -1), el trasplante de médula ósea (día 0), el chequeo de la implantación de las células trasplantadas (día 30), la implantación de bombas, el inicio de la alimentación con dieta grasa (días 30-31) y el sacrificio.

La eficiencia del trasplante también se verificó mediante análisis de la expresión de los niveles del gen *SRY* (gen presente en el cromosoma de Y en machos) usando

RT-PCR. Esta aproximación fue posible gracias a que los modelos de transplante se hicieron transplantando células de médula ósea procedentes de donantes macho en receptores hembra. Como patrón se emplearon mezclas de cantidades conocidas de ADN de macho y ADN de hembra. Sondas usadas: ATCTCTGTGCCTCCTGGAAA y GCAGGTGGAAAAGCCTTACA. Después del chequeo del transplante se procedió como en el modelo de AAA y el modelo de aterosclerosis antes descrito.

2.6. Inoculación intravenosa de lentivirus en arteria yugular

Para los experimentos de inoculación intrayugular de lentivirus, los animales fueron anestesiados mediante administración intraperitoneal de Ketamina / Silacina (1.5 ml de ketamina y 0.5 ml de Silacina en 10ml de suero salino). Después se realizó una incisión en el cuello, a la altura de la clavícula, por donde se podía observar la arteria yugular y se inyectaron los lentivirus (10^9 partículas víricas/en 100 μ l de DMEM). Posteriormente, se presionó la zona donde se había producido la inyección, para evitar la pérdida de sangre, y se cerró la herida. La infección se realizó 1 mes antes de la implantación de las minibombas de AngII y la eficiencia de infección se analizó mediante inmunohistoquímica de la proteína verde fluorescente (GFP).

2.7. Modelo de migración de macrófagos *in vivo*

Animales *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} fueron inoculados intraperitonealmente con tioglicolato (3% wt/vol). 4 días después también se inoculó intraperitonealmente en algunos animales 50 μ g de LDL o 50 μ g de LDLox 1h antes de una inoculación intraperitoneal similar de LPS (250 μ l, 5 μ g/ml). Posteriormente, los macrófagos del peritoneo fueron extraídos mediante lavados con PBS, contados y teñidos con anticuerpo anti-CD11b (BD Pharmigen). El contenido de células Cd11b+ fue analizado mediante citometría de flujo.

3. Procesamiento de muestras humanas

Las arterias coronarias y las mamarias internas fueron obtenidas de pacientes sometidos a transplante o bypass-coronario, respectivamente, en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain). Los estudios fueron aprobados por el Comité Etico y realizados acorde a la Declaración de Helsinki. Inmediatamente después de la obtención de las arterias de los pacientes, toda la grasa y el tejido conectivo se limpió cuidadosamente y posteriormente estas muestras se utilizaron bien para inmunohistoquímica (Apartado 17.1) o para inmunoblot (Apartado 21).

4. Cultivos celulares

4.1. Células de músculo liso vascular (CMLVs) de rata y de ratón

Se obtuvieron segmentos de aortas abdominales y torácicas de ratas Wistar y de ratones; C57BL/6 silvestres, *Rcan1*^{-/-}, *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-}. Las aortas extraídas se mantuvieron en PBS 1x frío en campana de cultivos mientras que con unas pinzas se eliminó la grasa y el tejido conectivo que las rodea. Posteriormente, fueron cortadas en pequeños anillos que se incubaron 45 min a 37°C en 95% aire 5% CO₂ en DMEM sin suero (Invitrogen) con 2 mg/ml de collagenasa tipo II. La digestión con collagenasa fue parada transcurridos los 45 min usando DMEM suplementado con 20% de suero fetal bovino (FBS) y los anillos fueron centrifugados a 1200 rpm para sembrarlos posteriormente en DMEM con 20% FBS. Estos explantes se mantuvieron sin manipulaciones adicionales durante 5 días. Después de este tiempo, el cultivo fue tripsinizado y sembrado posteriormente a una dilución apropiada a la confluencia de las células. Todos los experimentos aquí descritos se realizaron con células de pases entre 3-7.

Antes de los experimentos de estimulación, el medio de las células fue sustituido por DMEM sin FBS durante 48h. Para estos experimentos las células se trataron con los compuestos y las concentraciones indicadas en la Tabla 1.

4.2. Células endoteliales de pulmón de ratón (MLECs)

Las células endoteliales de pulmón de ratón se obtuvieron a partir de pulmones de ratones sacrificados mediante dislocación cervical. Los pulmones fueron digeridos con 0.2% de collagenasa P (Roche) durante 1h a 37 °C. Posteriormente, fueron disgregados para conseguir una suspensión de células homogénea, y estas células fueron sembradas sobre 0.5% gelatina suplementada con 100 mg/ml de colágeno tipo I (Sigma) en medio DMEM F-12 (BioWhittaker BE. 12-719F) con 20% FBS, heparina (100 mg/ml) (Sigma), factor de crecimiento de células endoteliales (ECGF) (5 mg/ml), glutamina (Sigma), y antibióticos (100 unidades/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina). Ya que en esta suspensión de células existe una mezcla de poblaciones celulares, se realizó una selección negativa el día siguiente empleando anticuerpo anti-CD16 (BD Biosciences) y bolas magnéticas (Dynal) para eliminar principalmente macrófagos. A los tres días se llevó a cabo una selección positiva de las células endoteliales empleando el anticuerpo ICAM-2 (BD Biosciences). Este protocolo permitió obtener una población de células endoteliales de más del 90% de pureza. Para los experimentos de estimulación estas células fueron incubadas en DMEM suplementado con 0.5% FBS durante una noche antes de su tratamiento con los compuestos empleados (Tabla 1).

4.3. Macrófagos peritoneales

Macrófagos peritoneales se obtuvieron mediante varios lavados intraperitoneales con PBS 1x 4 días después de una inyección intraperitoneal de 3% (wt/vol) de tioglicolato. Posteriormente, las células fueron sembradas en Alpha-MEM (Lonza) suplementado con 10% FBS, L-glutamina, y antibióticos. Los macrófagos fueron tratados con los compuestos que se indica en Tabla 1.

Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Uso
AngII	10 ⁻⁶ M ratón 10 ⁻⁵ M rata	Sigma Aldrich	Estimulación y ensayos migración (<i>CMLVs</i>)
AT ₂ RB (PD123319)	10 ⁻⁵ M	Sigma Aldrich	Inhibición del receptor AT ₂ (<i>CMLVs</i>)
AT ₁ RB (ZD-7155)	10 ⁻⁶ M	EMD, Tocris Bioscience	Inhibición del receptor AT ₁ (<i>CMLVs</i>)
PMA	10 ng/ml	Sigma-Aldrich	Estimulación de <i>CMLVs</i>
Ionóforo de calcio A23187 (Io)	1 μM	Sigma Aldrich	Estimulación de <i>CMLVs</i>
CsA	200 ng/ml	LD Laboratories	Inhibición de CN (<i>CMLVs</i>)
LDLoxidados	50 μg/ml	Biomedical Technologies	- Estimulación (<i>CMLVs</i> , <i>MLEC</i> , <i>Macrófagos</i>) - Migración (<i>Macrófagos</i>) - Formación de células espumosas (<i>Macrófagos</i>)
LDLacetiladas	50 μg/ml	Life Technologies	- Ensayos de acumulación de colesterol (<i>Macrófagos</i>)
LDL nativas	50 μg/ml	Life Technologies	- Formación de células espumosas (<i>Macrófagos</i>)
LPS	1 μM	Life Technologies	- Estimulación de <i>Macrófagos</i>

Tabla 1. Compuestos utilizados *in vitro*.

5. Transfección

5.1. *CMLVs*

Se emplearon plásmidos proporcionados por T. Minami (Research Center for Advance Science and Technology, Universidad de Tokio, Tokio, Japón) con el gen reportero de luciferasa regulado por el promotor intrónico de *Rcan 1-4* silvestre (-350/+83 DSCR-luc) o una versión de éste con los sitios de unión para NFAT mutados. Estos plásmidos

fueron transfectados en CMLVs empleando Lipofectamina PLUS (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células fueron mantenidas en medio completo con FBS durante 1 día y posteriormente en medio sin suero durante 48h antes de tratarlas con diversos estímulos durante 4h. Las células fueron lisadas y la actividad luciferasa detectada con el Ensayo de Luciferasa (Promega).

5.2. HEK293T (para producción de partículas lentivirales)

Para la producción de partículas lentivirales, las células embrionarias de riñón humanas (HEK293T) se transfectaron con la técnica de fosfato cálcico. Las células se sembraron en placas de 150 mm de diámetro a una confluencia del 30% en DMEM suplementado con 10% FBS, 2 mM glutamina, 100 U/ml de penicilina y estreptomicina. Una vez adheridas a la placa se co-transfectaron con i) plásmido pMD2G que codifica la glicoproteína de la envuelta viral VSV-G (vesicular stomatitis virus G) (obtenido de M. K.Collins del University College London,UK), ii) el plásmido 8.9 que codifica para los genes *gal*, *pol* y *rev* y iii) el vector lentiviral o codificante del péptidos de interés (los plasmidos de interes se muestran en la sección de producción de lentivirus). Para la transfección se mezclaron 36,25 µg de ADN de interés, 27,5 µg del plasmido 8.9 y 11 µg del plásmido pMD2G en 1250 µl de HBS (HEPES, NaCl, Dextrosa, KCl, Na₂HPO₄). Después se añadieron 75 µl de CaCl 2,5 M, se mezcló con ayuda del vortex y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Posteriormente, esta mezcla fue añadida sobre las células gota a gota. Transcurridas 16 horas, se cambió el medio de cultivo a 12,5 ml de DMEM suplementado con 10% FBS, glutamina, penicilina, streptomycin y se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂.

6. Producción de lentivirus y adenovirus e infección

Los péptidos de expresión de LxVP, su versión mutada (LxVP mutado) y VIVIT se clonaron fusionados a la proteína verde fluorescente (GFP), bajo la regulación del promotor SFFV (*spleen focus-forming virus*), en el vector lentiviral pHR SIN. Las construcciones pHA-CALP1L y pHACALP1S (proporcionados por la Dr. S. de la Luna) fueron clonadas en el vector lentiviral pHR SIN-IRES-GFP para generar los lentivirus pHR SIN-IRES-GFP, pHR SIN-HA-RCAN1-1-IRES-GFP o pHR SIN-HA-RCAN1-4-IRES-GFP. Todas las partículas lentivirales se generaron mediante transfección con fosfato cálcico en HEK293T como se ha explicado en el apartado anterior. El sobrenadante de estas células fue recogido 48h después de la transfección, filtrado utilizando filtros de 45 µm (Steriflip, Millipore) y centrifugado durante 2h a 26000 rpm a 4°C (Ultraclear Tubes, SW28 rotor and Optima L-100 XP Ultracentrifuge;

Beckman). Las partículas virales fueron resuspendidas en DMEM estéril a 4°C y se congelaron a -80°C para su conservación. El número de partículas infectivas obtenidas fue titulado mediante infección de células Jurkat. Las células Jurkat se infectaron con 1 µl, 0,1 µl ó 0,01 µl de sobrenadante de virus y tras 5 horas de infección el medio fue remplazado por medio nuevo. Las células se incubaron toda la noche y posteriormente la eficiencia de infección (células Jurkat positivas para GFP) y la muerte celular (tinción con ioduro de propidio) se analizó mediante citometría de flujo usando el citómetro BD FACS Canto II (BD Biosciences). Para el cálculo de título de los sobrenadantes lentivirales (unidades infectivas (pfu)/ml), asumimos que en el caso de la infección con 0,01 µl, cada célula GFP positiva ha sido transducida con una sola partícula viral.

La generación de adenovirus que codifican para GFP (AdGFP) o GFP fusionado a Rcan1-4 (AdGFP-Rcan1-4) previamente descritos (Minami et al., 2004) fue llevada a cabo por la unidad de vectores lentivirales del CNIC.

6.1. Infección de CMLVs con lentivirus

Las CMLVs se sembraron en placas de 35 mm (10^6 células/pocillo) para conseguir una confluencia del 80% en el momento de la infección. Las células se infectaron con 6×10^6 partículas infectivas (pfu) en DMEM suplementado con 20% FBS y se incubaron durante 5h a 37°C. Posteriormente, el medio fue remplazado por el mismo medio fresco. Las células se mantuvieron durante 48h y la infección se monitorizó mediante citometría de flujo. Posteriormente, estas células fueron utilizadas para ensayos de migración o para estimulación.

6.2. Infección de CMLVs con adenovirus

Las CMLVs fueron sembradas en placas de 12 pocillos (10^5 células/pocillo) e infectadas con 2×10^7 pfu en DMEM sin suero con adenovirus para la expresión de GFP (Ad-GFP) o GFP fusionado a Rcan1-4 (AdGFP-Rcan1-4). Tras 5 horas de infección, el medio fue remplazado por DMEM suplementado con 20% FBS. Al cabo de 72 horas, la eficiencia de infección fue determinada en base a la expresión de GFP mediante citometría de flujo y la expresión de la proteína Rcan1-4 fue analizada mediante inmunoblot.

6.3. Infección de macrófagos peritoneales con lentivirus

Los macrófagos peritoneales fueron sembrados en placas de 35 mm (10^6 células/pocillo), lavados 24h después con PBS 1x e infectados con lentivirus para la expresión de GFP o de RCAN1-1-IRES-GFP + RCAN1-4-IRES-GFP. Después de 24h de infección, el medio fue

remplazado por medio nuevo Alpha MEM suplementado con 10% FBS. La expresión de CD36 fue analizada 48h después de la infección. Para los ensayos de formación de células espumosas, el medio fue remplazado después de 24h y suplementado con 10% de suero deficiente en lipoproteína humana e incubado con 50 µg/ml LDLox durante 24h.

7. Ensayos de migración

7.1. Ensayos de transwell

Las CMLVs fueron resuspendidas en DMEM suplementado con 0.1% BSA y sembradas (5×10^4 células/pocillo) sobre membranas de cámaras quimiotácticas con poros de 8 µm (Costar). En la cámara inferior se añadieron 500 µl de DMEM suplementado con 0.1% BSA y diversos tratamientos; 10^{-6} M AngII, 10^{-6} M AngII + 200 ng/ml CsA, o 10% FBS. Después de 4 horas de incubación a 37°C en 95% aire, 5% CO₂, las células no migradas fueron retiradas del lado superior de la membrana y las migradas (presentes en el lado inferior) fueron fijadas con 4% de paraformaldehído (PFA) y teñidas con Hoechst. La cuantificación de las células migradas se efectuó mediante recuento de células en 10 campos de la membrana fotografiados al azar. Los experimentos fueron hechos por duplicado.

Los ensayos de migración en macrófagos peritoneales se realizaron en cámaras quimiotácticas con membranas de 5 µm de poro (Costar). Como estímulo quimiotáctico se utilizó medio de cultivo suplementado con 2% FBS y 10 ng/ml de MCP-1 (RD Systems). Las células fueron resuspendidas en Alpha-MEM suplementado con 0.1% BSA a una confluencia de 2×10^5 y con 50 µg/ml de lipoproteína (LDL, LDLoxidadas o LDL acetiladas), y fueron sembradas en la parte de arriba de las membranas. Después de 18 h, las células no migradas se limpian de las membranas y los núcleos de las células migradas son fijados y teñidos con Hoechst. La cuantificación se efectuó por recuento de células en fotografías de la membrana de 10 campos seleccionados al azar. Los experimentos fueron hechos por duplicado.

7.2. Ensayos de cierre de herida

CMLVs procedentes de ratones C57BL/6 silvestres y *Rcan1*^{-/-} fueron sembradas en placas de 35 mm de diámetro (10^6 células/pocillo). 24h después se realizó una herida homogénea en la monocapa de células y éstas fueron incubadas con o sin 10^{-6} M de AngII.

En el caso de los macrófagos peritoneales, se realizó una herida homogénea en la monocapa de células 3 días después de ser sembrados en placas de 35 mm de diámetro.

Después de varios lavados con PBS 1x las células fueron incubadas con 2% FBS más 100 ng/ml de MCP-1 con o sin 50 µg/ml de LDLox.

La migración de ambos tipos de células (CMLVs y macrófagos) a la zona desnuda se monitorizó a diferentes tiempos; en el caso de las CMLVs durante 4 horas, y en el caso de los macrófagos se monitorizó durante 18h. En ambos casos se utilizó un microscopio time-lapse con cámara de video incorporada. La cuantificación del número de células migradas a la zona desnuda se llevó a cabo usando el software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>).

8. Ensayos de actividad calcineurina

Extractos de CMLVs y extractos de aortas de ratones fueron analizados siguiendo las instrucciones del Kit de ensayo de Calcineurina Biomol Green Calcineurin (Enzo Life Sciences). Asimismo, extractos de macrófagos peritoneales estimulados o no con 1 µM LPS fueron analizados siguiendo las instrucciones del mismo kit.

9. Inmunofluorescencia en CMLVs *in vitro*

Las células fueron sembradas en una confluencia de 1×10^4 (células/pocillo) sobre cristales situados en placas de 24 pocillos. Fueron sometidas a diferentes tratamientos y posteriormente fijadas con 3% de (PFA), permeabilizadas con 0.1% de Triton X-100 e incubadas con anti-NFATc4 (1/100; Santa Cruz Biotechnology) y anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor488. Como control negativo se utilizó una IgG del mismo isotipo que el anticuerpo primario. Las imágenes de las células teñidas fueron tomadas usando un microscopio confocal invertido (LSM700; Carl Zeiss) con un objetivo de 63x Plan-Apochromat.

10. Marcaje de macrófagos

Macrófagos peritoneales fueron cultivados durante 72h y posteriormente, resuspendidos en PBS 1% BSA e incubados con bloqueantes de los Fc (Mouse Fc block BD Pharmingen 553141) 1/500 durante 10 min. Posteriormente, se incubaron durante 30 min a 4°C con anticuerpos primarios anti-mouse F4/80-PeCy7 (eBioscience, 25-4801), anti-CD36 (Abcam ab78054) o anti-SR-A (Santa Cruz sc 20444). Anticuerpos secundarios anti-conejo AlexaFluor647 (Invitrogen, A-21443) y anti-cabra AlexaFluor647 (Invitrogen, A-21469)

fueron incubados en PBS 1% BSA durante 15 min a 4°C. Las células fueron analizadas en citometría de flujo usando el citómetro BD FACS Canto II (BD Biosciences), y los datos fueron analizados con FlowJo software (Tree Star).

11. Ensayos de expansión celular

Macrófagos peritoneales fueron sembrados en placas de 24 pocillos (10^4 células/pocillo) en las que previamente se depositaron critales tratados con suero. Tras 20 min de incubación a 37°C para permitir su adherencia a la superficie, las células fueron estimuladas añadiendo 50 µg/ml de LDLox y fijadas con 4% de PFA tras 5, 15 o 30 min. Las células fijadas fueron teñidas con faloidina conjugada a AlexaFluor488. Las imágenes de las células teñidas fueron tomadas usando un microscopio confocal invertido (LSM700; Carl Zeiss) con un objetivo de 63x Plan-Apochromat. El perímetro de las células fue medido de forma automatizada con un software denominado Cell profile, y el grado de *spreading* o expansión fue determinado de acuerdo a la fórmula: $Spreading = \text{perímetro} / (4 \times \pi \times \text{área})$.

12. Ensayos de formación de células espumosas

Macrófagos peritoneales fueron sembrados sobre cristales localizados en placas de 24 pocillos (10^5 células/pocillo) e incubados en presencia o no de 50 µg/ml de LDL o LDLox a 37°C durante 24 horas. Las células fueron fijadas con 4% de PFA durante 15 min, teñidas con Oil Red O y contra teñidas con hematoxilina. La cuantificación se realizó en 10 campos de células por condición fotografiados al azar. Se consideró célula espumosa toda aquella que en su interior llevara 1 o más partículas visibles (rojo) de lípidos (Fig. 13).

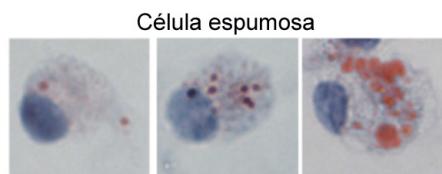


Figura 13. Imágenes representativas de células espumosas.

13. Microscopía de Laurdan GP

La técnica de microscopía de Laurdan GP (Bagatolli et al., 2003; Sanchez et al., 2007) se basa en analizar los compartimentos lipídicos en el interior celular gracias la tinción

con Laurdan. Los macrófagos peritoneales incubados o no previamente con 50 µg/ml LDLox, fueron cultivados en presencia de 1 µM de Laurdan (Molecular Probes, Grand Island, NY) durante 30 min en medio Alpha-MEM sin suero, usando DMSO como vehículo. Para analizar la fluorescencia del Laurdan las muestras fueron excitadas con un láser de titanio y zafiro (Spectra-Physics Mai Tai DS) a 780 nm y la emisión fue recogida entre 445-465 nm y 474-514 nm. Las imágenes de GP (512x512, 32 bits) fueron obtenidas con un microscopio ALBA (ISS, Illinois) equipado con un objetivo de 63x (1.2 NA) y analizado usando el software Image-J (NIH Image, National Institute of Health, Bethesda, MD). El valor de Laurdan GP fue calculado usando el valor de 0,57 para el factor G de Laurdan (Bagatolli et al., 2003) y de acuerdo a la fórmula:

$$\text{Laurdan GP} = \frac{I_{(425-465\text{nm})} - G \times I_{(476-514\text{nm})}}{I_{(425-465\text{nm})} + G \times I_{(476-514\text{nm})}}$$

Donde $I_{425-465}$ y $I_{476-514}$ son las intensidades de emisión de 445-465 y 474-514 nm respectivamente.

14. Ensayos de acumulación y salida de colesterol

Macrófagos peritoneales fueron sembrados en placas de 24 pocillos (5×10^5 células/pocillo). Transcurridas 24h fueron cultivados en Alpha-MEM suplementado con 10% de suero libre de lipoproteínas humanas, 2 µCi/ml de ^3H -colesterol (Perkin Elmer) y 50 µg/ml de LDL acetiladas (Biomedical Technologies), y se mantuvieron durante 24h para los ensayos de acumulación o 32h para los ensayos de salida de colesterol.

La acumulación de ^3H -colesterol fue medida en un contador de centelleo después de la extracción de lípidos de las células con hexano/isopropanol (2:1).

Para los ensayos de salida de colesterol, las células fueron lavadas cinco veces con PBS 1x y después incubadas durante 24h con Alpha-MEM suplementado con 100 µg/ml de HDL (Biomedical Technologies) o con 0.1% BSA (control negativo). El ^3H -colesterol expulsado al medio y el que permanecía en el interior de las células fue medido en un contador de centelleo.

El porcentaje de salida de colesterol inducida por HDL (% *efflux*) se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{salida (efflux)} = \left(\frac{\text{cpm en el medio}}{\text{cpm en el medio} + \text{cpm en las células}} \cdot 100 \right)^{\text{HDL}} - \left(\frac{\text{cpm en el medio}}{\text{cpm en el medio} + \text{cpm en las células}} \cdot 100 \right)^{\text{BSA}}$$

15. Ensayos de presentación de antígeno

Los macrófagos peritoneales fueron cultivados durante 2 horas en placas de 35 mm de diámetro (10^6 células/pocillo) en presencia de 2 mg/ml ovoalbúmina (OVA), lavados diez veces con PBS 1x y cultivados durante 5 horas en medio normal. Posteriormente, se añadieron 2×10^6 células T B3Z. Estas células constituyen un clon de células T que expresan β -galactosidasa al reconocer a través de su receptor TCR, el péptido SIINFELK de la OVA. El co-cultivo se incubó durante toda una noche, y la cuantificación de la actividad presentadora de antígeno fue realizada mediante la evaluación de la hidrólisis de rojo de clorofenol- β -Dgalactopyranoside (CPRG) (Calbiochem) y monitorizado con espectrofotómetro (O.D. 595-655).

16. Ensayos de fagocitosis

Los macrófagos peritoneales (3×10^6) fueron cultivados durante una noche en cristales situados en placas de 24 pocillos. Al día siguiente, las células no adheridas se eliminaron mediante lavados con PBS 1x y las células restantes fueron incubadas en ausencia de FBS durante 2 horas. Al mismo tiempo, se opsonizaron eritrocitos de oveja con IgG de conejo (MP Biomedicals) durante 1 hora en rotación a 4°C . Transcurridas las 2 horas en medio sin suero, se añadieron a los cultivos de los macrófagos 20 eritrocitos opsonizados por macrófago, y se incubaron a 37°C durante 15 min. La misma cantidad de eritrocitos sin opsonizar se añadió a un cultivo de macrófagos como control negativo de fagocitosis. Las células fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas con faloidina-TexasRed (Invitrogen), para delimitar la membrana celular, y con anticuerpo secundario anti-conejo AlexaFluor647 1/500 que detecta las partículas fagocíticas unidas a IgG de conejo. Los glóbulos rojos fagocitados por las células fueron cuantificados en fotografías de 10 campos tomados al azar por cada condición con microscopio de fluorescencia (Nikon A1R).

17. Análisis histológico

17.1. Procesamiento de tejidos

Los corazones y las aortas de los animales sacrificados fueron perfundidos con salino, y tanto estos tejidos como las arterias humanas fueron fijadas con 4% PFA durante 24h a 4°C . Posteriormente, estos órganos fueron deshidratados e inmersos en moldes de parafina antes de ser cortados en secciones transversales de $5 \mu\text{M}$ en micrótomos (Jung RM2055 Leica) para su tinción posterior. Alternativamente, para llevar a cabo tinciones con Oil Red, los tejidos frescos fueron embebidos en OCT. Para ello, los corazones fueron perfundidos con salino y fijados con 10% de PFA durante 24h a 4°C . Posteriormente

fueron incubados con PBS 1x suplementado con 30% de sacarosa durante otras 24h y finalmente embebidos en OCT (*optimal cutting temperatura compound*) y conservados a -80°C. Las crio-secciones de 5 µM fueron realizadas con un criostato.

17.2. Inmunohistoquímicas e Inmunofluorescencias

Las secciones de parafina fueron desparafinadas para rehidratar los tejidos e incubadas en buffer citrato (10 mM, pH 6.0) durante 20 min a 95°C para desenmascarar epítomos. Transcurrido este tiempo, fueron incubadas con solución de bloqueo durante 30 min con 10% suero de cabra o 10% suero de caballo (para inmunohistoquímica) o con 10% suero de caballo mas 2% BSA (para inmunofluorescencia) con el objetivo de bloquear uniones inespecíficas. Finalmente, fueron incubadas con los anticuerpos primarios durante toda la noche en solución de bloqueo (Tabla 2).

Para la inmunohistoquímica (IHQ) con los anticuerpos de Rcan1, CD3, GFP, Mac3 y Ter119, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado. La detección del color de la IHQ se realizó con DAB (Vector Laboratories) durante 10 minutos como tiempo máximo. Posteriormente, las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina, nuevamente deshidratadas y montadas con DPX (Fluka). Para el desarrollo del color en las IHQ de anti-SMA conjugado a la fosfatasa alcalina se utilizó Fast-Red (Sigma-Aldrich). La especificidad de los anticuerpos fue comprobada en cada experimento usando controles negativos por sustitución del anticuerpo primario con su correspondiente IgG inespecífica. Las imágenes fueron adquiridas a temperatura ambiente usando un microscopio Leica DM2500 con objetivos de 10x, 20x y 40x HCX PL Fluotar y usando el programa Leica Application Suite V3.5.0.

En el caso de las inmunofluorescencias (IF), los anticuerpos secundarios que se utilizaron fueron cabra anti-conejo conjugado a AlexaFluorCy3 (excitación a 555 nm y emisión a 500-610 nm), pollo anti-mouse conjugado a AlexaFluor488 (excitación a 488 nm, emisión a 505-600 nm), pollo anti-rata conjugado a AlexaFluor647 (Invitrogen; excitación a 633 nm, emisión a LP640 pseudocolor mostrado rojo en las imágenes) y Estreptavidina-AlexaFluor647 (Invitrogen; excitación a 633 nm, emisión a LP640 y pseudocolor mostrado verde en las imágenes). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (excitación a 405 nm, emisión a 420-475 nm).

Las muestras de IF fueron montadas con medio de montaje Citifluor AF4Citifluor AF4 (Aname) y las imágenes (1024 x 1024 pixeles; 8-bits) fueron adquiridas a temperatura ambiente con un microscopio confocal invertido (LSM700; Carl Zeiss) equipado con un objetivo de aceite de inmersión de 63x Plan-Apochromat. Las imágenes se analizaron en el programa Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) o en el MetaMorf (Molecular Devices; Sunnyvale, California) y se procesaron para presentación con el programa Zen 2009 Light Edition (Carl Zeiss) y con Adobe Photoshop.

Anticuerpo	Casa Comercial	IHQ	IF	Secundarios
Anti-Rcan1	D6694 Sigma-Aldrich	1/100 Aorta, AAA, Femoral, placa ateroma.	1/50 Aorta, AAA, Femoral, placa ateroma	IHQ:anti-IgG conejo 1/250 IF: anti-IgG conejo AlexaFlour Cy3 1/500
Anti-SMA Fosfatasa alcalina	A5691 Sigma-Aldrich	1/50 Aorta, AAA,		Conjugado a fosfatasa alcalina (Fast Red)
Anti-SMA	A5228 Sigma-Aldrich		1/200 Aorta, AAA, placa ateroma	IF: anti-IgG ratón AlexaFlour488 1/500
anti-Mac3	sc-1991; Santa Cruz Biotechnology	1/200 AAA, placa ateroma	1/100 placa ateroma	IHQ:anti-IgG rata 1/250 IF: anti-IgG rata AlexaFluor647 1/500
Anti-CD3	Dako A0452	1/200 AAA, Femoral	1/50 Femorales	IHQ:anti-IgG conejo 1/250 IF: anti-IgG conejo AlexaFlourCy3 1/500
Anti-vimentina	Abcam IR630		1/50 AAA	IF:anti-IgG conejo AlexaFluor488 1/500
Anti-GFP	Invitrogen	1/100 Aorta, AAA		IHQ:anti-IgG conejo 1/250
Lectina (biotinilada)	L2140, Sigma-Aldrich		1/20 placa ateroma	IF:Estreptavidina- AlexaFluor488 1/500
anti-Mrc1	MCA2235GA; Serotec		1/50 placa ateroma	IF: anti-IgG rata AlexaFluor647 1/500
anti-Ter119	553672; BD	1/100 placa ateroma		IHQ:anti-IgG conejo 1/250
anti-IL-10 (biotinilado)	Diaclone		1/100 placa ateroma	IHQ:Estreptavidina- AlexaFluor647 1/500
anti- macrófagos humanos	M1919 Sigma	1/200 placa ateroma humano		IHQ: anti-mouse 1/250

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para análisis histológico.

17.3. Tinciones de tejidos con colorantes

17.3.1. Tricrómico de Masson

Esta tinción se realizó tanto en muestras de parafina como de OCT. Las muestras de parafina fueron desparafinadas antes de la tinción. Mientras que las muestras de OCT fueron teñidas directamente. Se utilizaron cuatro colorantes siguiendo las instrucciones del kit (Merck): Hematoxilina de Weigert (5 min, azul, tinción de núcleos), Azofloxina (10-12 min, rojo, tinción de citoplasma y músculo), ácido fosfotungstácico (1 min, naranja, eritrocitos), verde luz (7 min, verde, tejido conectivo colágeno). El análisis de contenido de colágeno se realizó utilizando los programas MetaMorf (Molecular Devices; Sunnyvale, California) e ImajeJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>).

17.3.2. Hematoxilina & Eosina

Las secciones desparafinadas fueron teñidas con hematoxilina de Harris durante 3 min, lavadas dos veces en agua destilada e incubadas con 5% de Eosina durante 5 min. Las secciones fueron nuevamente deshidratadas y montadas con DPX.

17.3.3. Van Gieson

Las secciones desparafinadas fueron teñidas con Hematoxilina de Weigert durante 10 min, lavadas en agua destilada e incubadas con la solución de Van Gieson (Fucsina acida y ácido pícrico) durante 30-60 segundos. Las secciones fueron nuevamente deshidratadas y montadas con DPX.

17.3.4. Oil Red O

Las secciones tisulares en OCT fueron lavadas con agua destilada durante 10 min, sumergidas 4 veces en isopropanol al 60% y expuestas 20 min en una solución de 0.5% Oil Red O en isopropanol (Sigma O0625). Tras lavarlas nuevamente en isopropanol, fueron contrateñidas con Hematoxilina de Mayer's y montadas con medio acuoso.

17.3.5. Tinciones de aorta completa con Oil Red (en face)

Las aortas de los ratones sacrificados fueron extraídas desde la zona torácica a la zona del cayado aórtico. Toda la grasa y el tejido conectivo adventicial fueron retirados cuidadosamente bajo la lupa, de forma que al final quedaba al descubierto la anatomía completa de la aorta torácica, con sus 3 bifurcaciones en la zona del cayado. Las aortas fueron posteriormente fijadas en 4% de PFA durante 24h y teñidas con 0.2% de Oil Red O (Sigma O0625) en 80% metanol durante 1h. Las aortas fueron abiertas longitudinalmente

y clavadas a una superficie de silicona, de manera que la zona luminal de la arteria quedara expuesta. Las imágenes fueron adquiridas con una lupa Olympus SZX10 acoplada a una cámara Olympus UC30 (Olympus, Germany). El análisis planimétrico en 2D del área de lesión fue realizado en píxeles usando el programa ImageJ y convirtiéndolo a mm².

17.4. Ensayo de *Southwestern in situ*

Las secciones de aorta de 5 µm de grosor desparafinadas fueron fijadas en 0.5% de PFA en PBS 1x durante 25 min a 28°C. La fosfatasa alcalina endógena fue bloqueada con 5 mM de levamisol (Sigma-Aldrich). Las preparaciones fueron digeridas con 0.5% de pepsina A (Sigma-Aldrich) en 1 N HCl durante 35 min a 37°C y lavadas en tampón HEPES/BSA (10 mM HEPES, 40 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ditioneitol [DTT], 1 mM EDTA, y 0.25% BSA, pH 7.4). Las secciones fueron incubadas con 0.1 mg/ml DNase I en la solución anterior durante 30 min a 30°C. Las formas de NFAT activas fueron reconocidas por la sonda '5-GATCGCCCAAAGAGGAAAATTTGTTTCATACAG-3'. Esta secuencia contiene tanto la zona de interacción con NFAT como la de AP1 del promotor de IL-2 de ratón (Jain et al., 1993). La sonda de NFAT fue marcada con digoxigenina (Sigma-Aldrich) y diluida a 25 pM en una solución de trabajo I (0.1 M ácido maleico y 0.15 M NaCl, pH 7.5) conteniendo también 0.5 mg/ml poly dI-dC; (Sigma-Aldrich). Se utilizaron los siguientes controles negativos: (i) ausencia de sonda; (ii) mutante de la sonda de NFAT (5'-GATCGCCCAAAGACCTTAATGGACTTCATACAG-3'), (iii) Sonda de NFκB (5'-GATCAGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'); y (iiii) ensayo de competición, en el cual las secciones fueron incubadas con 200 veces de exceso de sonda no marcada antes de la aplicación de la sonda marcada. Después de una noche de incubación a 37°C en una cámara húmeda, las secciones fueron lavadas dos veces con solución de lavado (0.03% Tween 20 en solución de trabajo I) e incubadas 1h en solución de bloqueo (0.1% SSC y 0.1% SDS diluido 1:10 en solución de lavado). Las preparaciones se lavaron de nuevo dos veces más con solución de lavado y se incubaron 2h a 37°C con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (1:200 en solución de bloqueo; Roche). Las secciones fueron lavadas nuevamente en solución de lavado y en la solución III (Tris-HCl 0.1 M, 0.1 M NaCl, y 50 mM MgCl₂, pH 9.5) a temperatura ambiente. La presencia de la fosfatasa alcalina se visualizó con nitroblue tetrazolium clorídico y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (NBT/BCIP; Roche). La reacción se paró por incubación en buffer TE (10 mM Tris y 1 mM EDTA, pH 8.0), y las secciones fueron deshidratadas en gradientes de etanol y montadas en 50% de glicerol en PBS.

18. Método Óptico No –lineal en 3D (NLO-3D)

Las aortas son extraídas y teñidas como se describe en el Apartado 17.3.5 (Tinción de aorta completa con Oil Red). Posteriormente, estas aortas ya analizadas en 2D son

posicionadas abiertas longitudinalmente con el lumen hacia arriba, sobre unas cámaras especialmente diseñadas por nosotros, en las cuales también añadimos PBS/glicerol (50%), y todo ello lo cubrimos con un cristal de montaje (Fig. 14A). Usamos la onda de excitación (800nm) de un microscopio de 2 fotones (Zeiss 780) para generar 3 señales de confocal de estas aortas. Obtenemos la señal de la segunda harmónica para el colágeno (señal recogida entre 347-424 nm) y utilizamos la fluorescencia de excitación de los 2 fotones para obtener la autofluorescencia de la elastina (482-560 nm) y la fluorescencia del Oil Red (602-697 nm) (Fig. 14B-C). Las secciones ópticas fueron tomadas cada 3 μ M, y posteriormente se utilizó el programa Imaris para realizar la reconstrucción 3D. Para más información del método *Anexo III*).

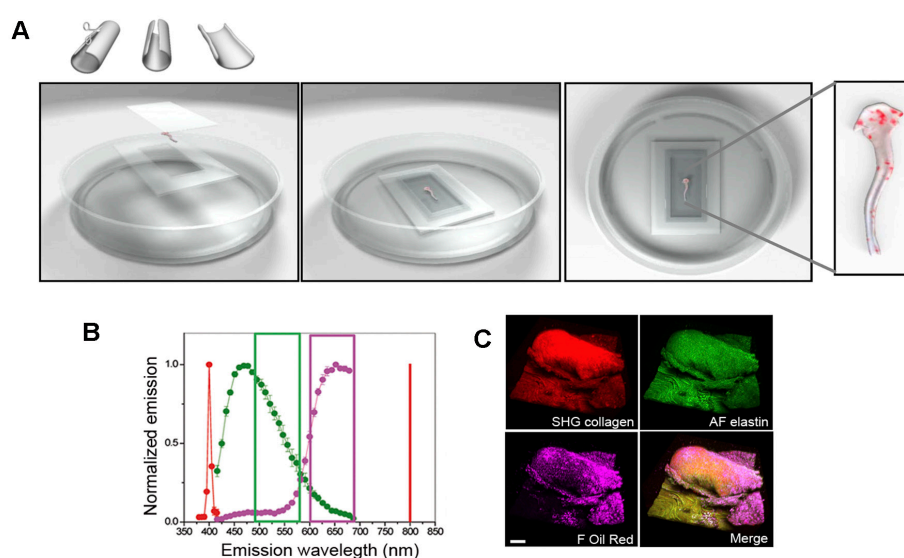


Figura 14. (A) Cámaras diseñadas para poder medir tanto por el método de *en face* como por el método de NLO-3D. **(B-C)** Señales espectroscópicas utilizadas para la adquisición de imágenes en NLO-3D. La onda de excitación se fijó en 800 nm, y se detectaron 3 señales a la vez; SHG segunda harmónica de la señal del colágeno (347-424 nm) en rojo, la autofluorescencia de la elastina (482-560 nm) en verde, y la fluorescencia del Oil Red (602-697 nm).

19. Extracción de ácidos nucleicos y PCR cuantitativa

Los extractos de RNA totales de células se lisaron utilizando el reactivo Tripure (Roche). Para los extractos de RNA de tejido, estos se congelaron en nitrógeno líquido y se trituraron con ayuda de un mortero. El polvo se disolvió en Tripure y se disgregó con el equipo MagNALyser (Roche). Una vez obtenidos los lisados se continuó la extracción acorde con las instrucciones de fabricante para el reactivo Tripure. La cantidad de ARN fue cuantificada en el Nanodrop y 2 μ g de ARN fueron transcritos a 37°C durante 50 min en una reacción de 20 μ l de volumen que contenía: 200 unidades de la transcriptasa reversa MML-V (MMLV Moloney murine leukemia virus), 100 ng de oligos aleatorios, y 40 unidades

de inhibidor de RNasas (Life Technologies). La PCR a tiempo real se llevó a cabo con 50 ng de ADNc utilizando el sistema de análisis de expresión génica SYBR Green (Applied Biosystems) o Taqman dependiendo de los genes a analizar y siguiendo las instrucciones de la casa comercial, usando el termociclador ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Las sondas utilizadas se presentan en las Tablas 3 y 4.

Gen	Referencia Sonda Taqman	Especie
<i>Rcan1</i>	(Rn00596606_m1)	rata
<i>Rcan1</i>	(Mm00627762_m1)	ratón
<i>Hprt1</i>	(Mm00446968_m1)	ratón
<i>Tbp</i>	(Mm00446973_m1)	ratón
<i>GAPDH</i>	Hs.PT.39a.22214836)	humano
<i>RCAN1-1</i>	Hs01120956_m1	humano
<i>RCAN1-4</i>	Oligos: GCAAACAGTGATATCTTCAGCGAAA GTGATGTCCTTGTCATACGTCCTAA Sonda CAGGGCCAAATTT	humano

Tabla 3. Sondas Taqman utilizadas.

Gen	Referencia Oligos SYBR Green	Especie
<i>IL-10</i>	TGCTATGCTGCCTGCTCTTA TCATTTCGATAAGGCTTGG	Ratón
<i>Mrc1</i>	ATGCCAAGTGGGAAATCTG TGTAGCAGTGGCCTGCATAG	Ratón
<i>Arg1</i>	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG AGGAGCTGTCATTAGGGACATC	Ratón
<i>Mcp-1</i>	ACACCCTACAAACCGGAACC AGCCTTCCTGTCATAGTATTCTT	Ratón
<i>Abca1</i>	AGTGATAATCAAAGTCAAAGGCACAC AGCAACTTGGCACTAGTAAGTCTG	Ratón
<i>Abcg1</i>	TTCATCGTCCTGGGCATCTT CGGATTTTGTATCTGAGGACGAA	Ratón
<i>SR-A</i>	TGAACGAGAGGATGCTGACTG GGAGGGGCCATTTTGTAGTGC	Ratón
<i>Mmp2</i>	GCACCACCGAGGACTATGAC ACTTGTGCCCAGGAAAGTG	Ratón
<i>Mmp9</i>	CAAATTCTTCTGGCGTGTGA CGGTTGAAGCAAAGAAGGAG	Ratón
<i>iNos</i>	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG	Ratón
<i>m36B4</i>	GCGACCTGGAAGTCCAATA ATCTGCTGCATCTGCTTGG	Ratón
<i>SRY</i>	ATCTCTGTGCCTCCTGGAAA GCAGGTGGAAAAGCCTTACA	Ratón

Tabla 4. Oligos SYBR Green utilizadas.

Los transcritos de *18S ARNr* fueron utilizados como control interno en las muestras de rata, mientras que el control interno en ratón fue *Tbp* y *Hprt* y en humano fue *GAPDH*. Los controles internos fueron amplificados en el mismo tubo, con el objetivo de normalizar posibles variaciones en la cantidad de ARN entre muestras. La cantidad de ARNm de las muestras fue estimada por el método de cuantificación relativa de $2\Delta CT$. En el caso de SYBR Green (Tabla 4) usamos el mismo método de cuantificación relativa utilizando *m36B4* como control interno.

20. Ensayo de arrays (agilent gene)

El ARN total de CMLVs en cultivo estimuladas con salino, AngII, CsA, o CsA más AngII fue extraído con Tripure (n=4), procesado y marcado con Cy3-cRNA para hibridarlo con un array de genoma completo de ratón G4122F 4 X 44K (Agilent Technologies). Los arrays fueron escaneados y analizados usando el programa Feature Extraction v9.5.3.1 (Agilent Technologies). Se asignó el valor 1 a los valores crudos y se normalizaron usando cuartiles (Bolstad et al., 2003). Finalmente, se usó ANOVA de una sola cola para identificar muestras que cambian al menos en una condición ($p < 0.05$), con el objetivo de analizarlas en profundidad. 1868 muestras fueron usadas para análisis de expresión génica diferencial, el cual fue hecho con el programa Limma Packaged Bioconductor (Smyth, 2004). Los datos crudos de expresión están disponibles en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/> con el número de acceso GSE31321.

21. Inmunoblot

Las muestras de tejido aórtico humano o de ratón fueron congeladas en nitrógeno líquido, guardados a -80°C y triturados con el mortero. Posteriormente se lisaron en 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, 1% sodio dioxiclato, 0.1% SDS, 150 mM NaCl y 5 mM EDTA, suplementado con 1 μM ditioneitol, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoruro, 100 μM benzamidina, 1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatina y 1 $\mu\text{g/ml}$ aprotinina, y se homogenizaron en el MagNALyser (Roche).

Las células en cultivo estimuladas fueron lavadas con PBS 1X frío y congeladas a -80°C antes de ser lisadas con un tampón de lisis (Hepes 20 mM pH7.6, NaCl 400 mM, EDTA 1 mM, EGTA 3 mM, DTT 1 μM , PMSF 1 mM, Na_2MoO_4 10 mM, benzamidina 100 μM , pepstatina, aprotinina y leupeptina (1 $\mu\text{g/ml}$) y Triton X-100 1%).

Los lisados celulares y de tejido se incubaron en agitación a 4°C durante 15 min, se centrifugaron (13200 rpm) a 4°C durante 15 min. La fracción soluble (sobrenadante) se transfirió a un nuevo tubo, y se cuantificó por la técnica de Bradford o Lowry. Posteriormente, a 30 μg de proteína se le añadió tampón Laemmli (60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol, 0.01% azul de bromofenol) y se incubó durante 10 min a

100°C. Los extractos obtenidos se sometieron a una electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Las proteínas presentes en estos geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante la aplicación de un corriente eléctrica continua en presencia del tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 10%). Las membranas se lavaron con tampón Tris-HCl pH7,5 con detergente Tween 20 al 0,05% (TBS-T) y se incubaron durante 30 min con una solución de leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T. Tras 3 lavados con TBS-T, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios preparados en TBS-T suplementado con BSA 1% y 0,1% de azida sódica. Tras la incubación con los anticuerpo primario (Tabla 5), las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (anti-ratón o anti-conejo, Pierce) durante 1h. Por último, las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron con el reactivo ECL (*Enhanced Chemiluminescence*, Amersham) para detectar las proteínas reconocidas por los anticuerpos.

Anticuerpo	Casa Comercial	Concentración
anti-NFATc1	Enzo Life Science	Monoclonal de ratón 1/1000
anti-NFATc2	Abcam	Monoclonal de ratón 1/1000
anti-NFATc3	Santa Cruz Biotechnology	Policlonal de conejo 1/1000
anti-NFATc4	Santa Cruz Biotechnology	Policlonal de conejo 1/1000
anti- α tubulina	Sigma-Aldrich	Monoclonal de ratón 1/40000
Anti-PSF (<i>PTB-associated splicing factor</i>)	Sigma-Aldrich	IgG1 ratón 1/1000
anti-Rcan1	Sigma- Aldrich	Policlonal de conejo 1/1000
anti- α -actin	Dako	1/10000
anti-Gsk3 β	Cell Signaling	1/1000

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para inmunoblot.

22. Analisis estadistico

Los datos representados son las medias aritméticas \pm la desviación estándar correspondientes a un mínimo de 3 experimentos. El estudio estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza (one-way o two-way ANOVA) seguido del test de Bonferroni (para los experimentos de >3 grupos) o mediante el estudio de t de Student, en función de lo más apropiado para los datos. Las diferencias se consideraron significativas a partir de $p < 0,05$ (***) $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).



RESULTADOS

RUTA ANGII/CN/NFAT

1. AngII activa la ruta CN/NFAT en CMLVs

Dado que AngII induce la movilización de Ca^{2+} intracelular, nuestro primer objetivo fue esclarecer si este estímulo podría activar la ruta de señalización CN/NFAT en células de la pared vascular. Para ello tratamos ratones C57BL/6 con minibombas de infusión de AngII durante tiempos establecidos y analizamos la presencia de NFAT en el núcleo de las células de la pared arterial mediante un ensayo *in situ* de southwestern en secciones aórticas. Observamos que AngII inducía la activación y translocación al núcleo de NFATs en CMLVs, células endoteliales y células de la adventicia y que esta activación era sostenida durante al menos 7 días (Fig. 15A). Además, la activación de NFAT se inhibía cuando estos animales eran tratados con CsA o con el antagonista del receptor AT_1 Losartan, pero no con el antagonista del receptor AT_2 PD123319 (Fig. 15B). El patrón de southwestern observado era similar al de la tinción de SP1 (Fig. 15C), usado como control positivo de expresión nuclear.

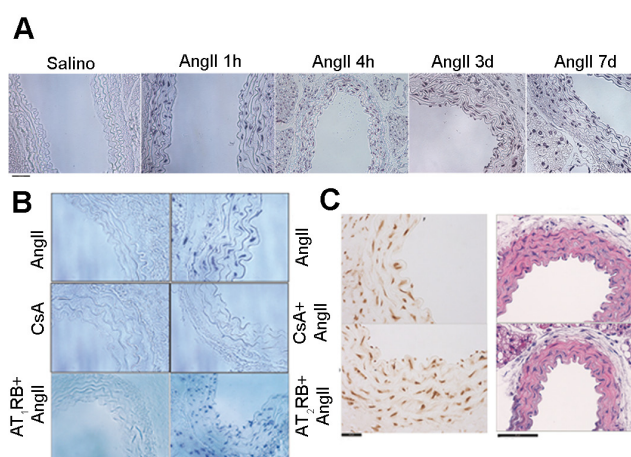


Figura 15. AngII activa la ruta CN/NFAT *in vivo* en aorta. (A-B) Imágenes representativas de ensayos de southwestern específicos de NFAT en secciones aórticas de ratones C57BL/6 tratados mediante minibombas osmóticas subcutáneas con **(A)** AngII (1 µg/kg/min) durante los tiempos indicados o con **(B)** CsA (5 mg/kg/d), Losartan (AT_1RB , 10 mg/kg/d) o PD123319 (AT_2RB , 30 mg/kg/d) durante 24 h previas a la administración de AngII (1 µg/kg/min) durante 1 h. Escala, 50 µm. **(C)** Imágenes de inmunohistoquímica (IHQ) de SP1 (izquierda) y de tinción de hematoxilina eosina (HE) (derecha) en secciones aórticas. Escala, 50 µm.

Posteriormente nos propusimos identificar los miembros de la familia NFAT activados por AngII en CMLVs de ratón. Para ello analizamos por inmunoblot su expresión y estatus de desfosforilación. Mientras que la expresión de NFATc1, NFATc3 y NFATc4 era detectable en estas células, NFATc2 no pudo ser detectado (Fig. 16A). En cambio, las células Jurkat usadas como control de expresión de NFATc2, si mostraban niveles elevados de este

miembro (Fig. 16A). El mismo patrón de expresión de miembros de esta familia fue observado en CMLVs de rata (Fig. 16B). La estimulación con AngII durante 1h activó la ruta CN/NFAT en CMLVs primarias de ratón y de rata, como se evidenció por la desfosforilación de los miembros NFATc1, c3 y c4 (Fig. 16A-B). Esta desfosforilación era similar a la que producía la combinación de éster de forbol + ionóforo de calcio (PMA/Io), usada como control positivo, y se inhibía por tratamiento de estas células con CsA o con un antagonista del receptor AT_1 , pero no del receptor AT_2 (Fig. 16A-B). Estos datos sugerían que AngII activa la ruta CN/NFAT, tanto *in vivo* como *in vitro*, a través del receptor AT_1 .

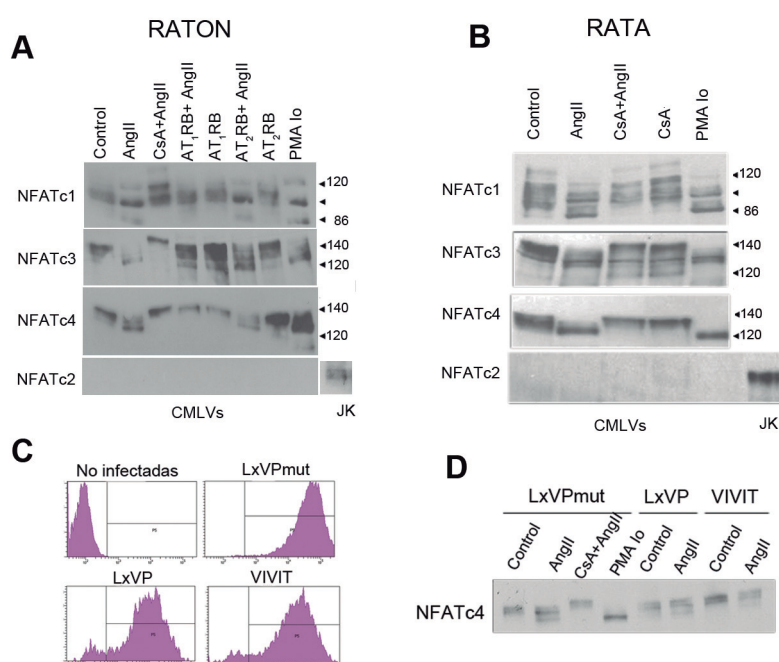


Figura 16. AngII activa la ruta CN/NFAT *in vitro* en CMLVs: (A-B) Inmunoblot de NFAT en extractos de CMLVs de ratón y de rata estimuladas con 10^{-6} M de AngII (ratón) o 10^{-5} M (rata) (+0,3 mM calcio en ambos casos) durante 1 h después de un pretratamiento de 1 h con 200 ng/ml de CsA, o 10^{-6} M de antagonista de AT_1 R (ZD-7155), o 10^{-5} M de antagonista de AT_2 R (PD123319). Las puntas de flecha indican los diferentes grados de desfosforilación de los miembros de NFAT. El análisis de NFATc2 fue testado en paralelo con proteínas de extractos de células Jurkat (JK). **(C)** CMLVs de ratón fueron infectadas con lentivirus GFP-unido a LxVP, LxVPmut, o VIVIT y los niveles de expresión de GFP fueron analizados por citometría de flujo. Las gráficas representan la población GFP positiva y negativa para Ioduro de Propidio dada en unidades logarítmicas. **(D)** Inmunoblot de NFATc4 de extractos de proteína de células infectadas con lentivirus LxVPmut, LxVP, y VIVIT y estimuladas con 10^{-6} M AngII durante 1 h.

Para un análisis más exhaustivo de la implicación de la CN en la activación de NFAT por AngII en CMLVs, se utilizaron además de CsA, inhibidores peptídicos de CN. Para este fin se generaron lentivirus que codificaban para proteínas de fusión GFP-péptido, en las que el péptido empleado contenía las secuencias específicas LxVP o PxIxIT de inhibición de CN o una versión mutada e inactiva de LxVP (Martinez-Martinez et al., 2006; Rodriguez et al.,

2009). Infectamos CMLVs con estos lentivirus, monitorizamos su eficiencia de infección mediante citometría de flujo y observamos que >80% de las células estaban infectadas y expresaban altos niveles de proteína verde fluorescente (GFP) (Fig. 16C). En estas células, la expresión de los péptidos LxVP y VIVIT inhibió la desfosforilación de NFATc4 mediada por AngII, al contrario que la expresión de la forma mutada de LxVP, LxVPmut (Fig. 16D).

2. La CN regula la migración inducida por AngII en CMLVs

La AngII tiene un papel fundamental en procesos implicados en el desarrollo de patologías vasculares, como son la migración y la proliferación de CMLVs. Con el objetivo de investigar el papel de CN en la migración de CMLVs inducida por AngII, realizamos ensayos de migración en transwell. Los resultados obtenidos mostraron que AngII estimulaba la migración de las CMLVs alrededor de 5 veces (comparado con las células control no estimuladas) y que el pretratamiento con CsA inhibía la migración en respuesta a AngII hasta alcanzar niveles basales (Fig. 17A-B).

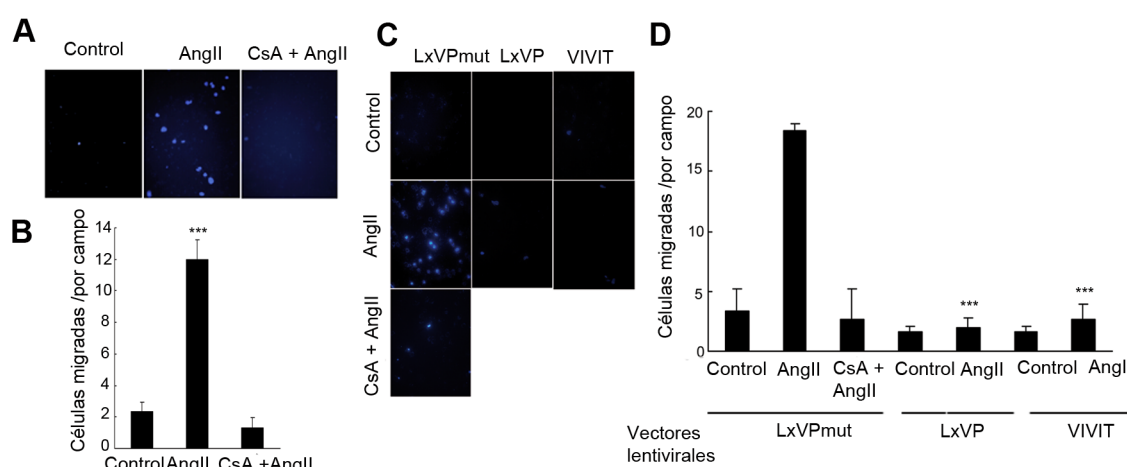


Figura 17. La CN media la migración de las CMLVs inducida por AngII. CMLVs de ratón fueron sembradas en la parte de arriba de una membrana porosa de transwells. El número de células migradas fue analizado después de 4 h en las membranas teñidas con Hoechst. **(A-B)** En la parte de abajo se añadieron AngII (10^{-6} M) o AngII (10^{-6} M) + CsA (200 ng/ml) **(A)** Imágenes representativas de la superficie de las membranas de los transwell. Escala, 50 μ m. **(B)** Cuantificación de las CMLVs migradas en 10 campos al azar por condición en un experimento representativo de 7 realizado por triplicado (media \pm SEM). **(C-D)** CMLVs infectadas con lentivirus que expresan GFP-unido a LxVP, LxVPmut, o VIVIT y tratadas según está indicado. **(C)** Imágenes representativas de la superficie de las membranas de los transwell de las células infectadas y migradas. Escala 50 μ m. **(D)** Cuantificación de células migradas en 10 campos por condición, en un experimento representativo de 7 realizado por triplicado (media \pm SEM). ***p<0,001.

Estos resultados sugerían que CN podría ser un mediador esencial de la inducción de migración de CMLVs por AngII. Apoyando estos datos, la infección de CMLVs con lentivirus que codifican para los péptidos LxVP o VIVIT fusionados a GFP inhibió la migración de estas células en respuesta a AngII (Fig. 17C-D). En cambio, la infección con el péptido mutado LxVPmut no tuvo ningún efecto sobre este proceso (Fig. 17C-D).

3. La CN es un mediador del remodelado vascular patológico inducido por AngII

Dado que la ruta CN/NFAT tiene un papel clave en los procesos de migración de CMLVs inducidos por AngII, nos planteamos evaluar su papel *in vivo* en modelos de daño vascular en los que la migración de estas células es fundamental. Para este fin utilizamos modelos de remodelado vascular patológico en ratón como el desarrollo de AAA y la formación de neoíntima en daño femoral.

3.1. La CN es un mediador de la formación de neoíntima inducida por AngII y daño femoral

El modelo de daño femoral en ratón mimetiza el causado por la angioplastia en humanos. Por medio de la introducción de una guía de 0,25 mm en la arteria femoral del ratón generamos una desendotelización y un daño en la pared del vaso, que implica migración de CMLVs y formación de neoíntima (Roque et al., 2000). Este daño mecánico, por sí solo, promovía un remodelado vascular hacia el interior del vaso con formación de neoíntima en ratones C57BL/6 (Fig. 18). La infusión de AngII, unida al daño mecánico, incrementó el grosor de la capa de neoíntima, como quedó reflejado en el pronunciado incremento de la relación íntima/media (I/M) y en la disminución del tamaño del lumen, sin interferir en la integridad de las capas elásticas (Fig. 18). El tratamiento con CsA de estos animales 24h antes del daño y durante la infusión de AngII no solo evitaba el remodelado producido por la AngII, sino que también protegía del daño basal inducido por la introducción del catéter (Fig. 18A). Las diferencias observadas debidas al tratamiento con CsA quedaron plasmadas en la reducción del cociente I/M y en la reducción del porcentaje de estenosis hasta niveles casi basales (Fig. 18B-C).

Estos resultados sugerían que la activación de CN por AngII estaba implicada en los procesos de formación de neoíntima.

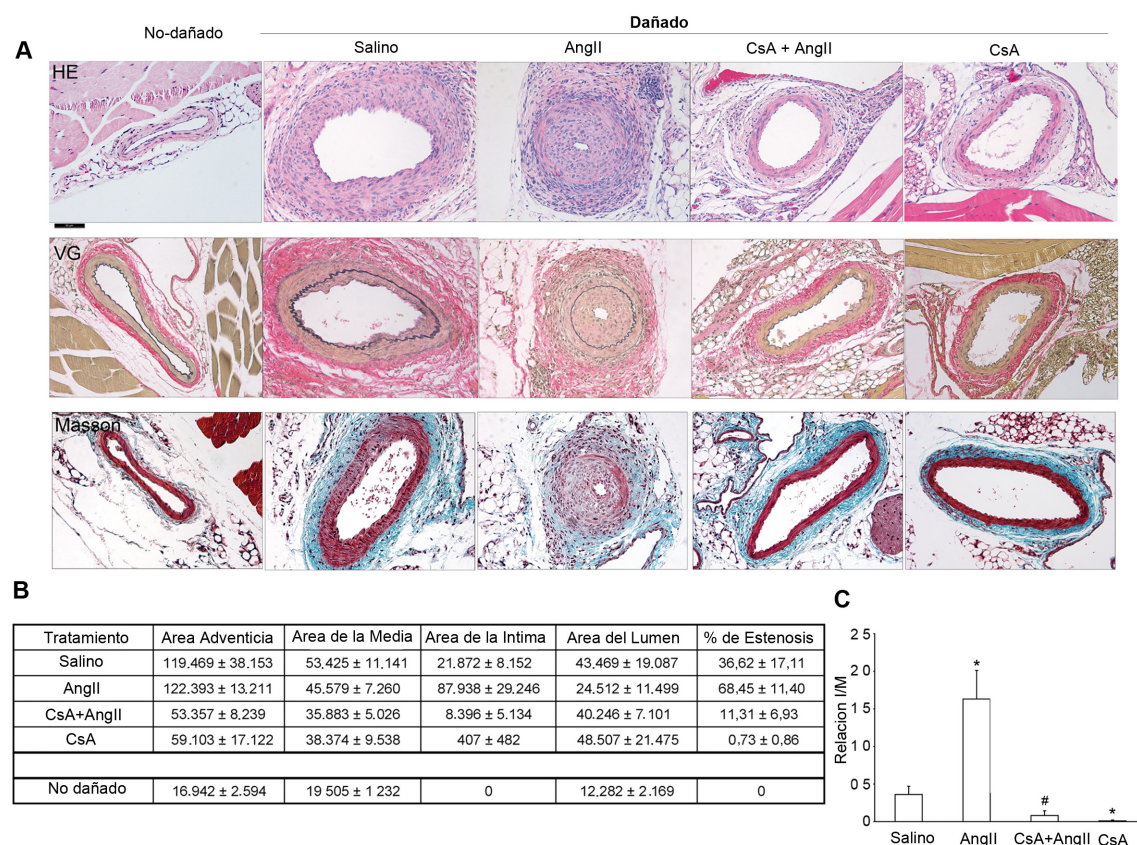


Figura 18. CsA inhibe la formación de neoíntima inducida por AngII en un modelo de daño en arteria femoral. La arteria femoral derecha fue dañada por medio de la introducción de un catéter y por la posterior infusión de AngII (0,5 µg/kg/min) mediante minibombas osmóticas subcutáneas. La administración de CsA (5 mg/Kg/d) comenzó 24 h antes del tratamiento con AngII y se mantuvo durante el periodo de infusión de AngII. **(A)** Imágenes representativas de secciones de arteria femoral teñidas con HE, Van Gieson (VG) y Tricrómico de Masson (Masson). Escala, 50 µm. **(B)** Resumen de los datos morfométricos en los diferentes grupos de tratamiento. El área está representada en micrómetros cuadrados (mm²). Debido a que la monocapa de células endoteliales aparece como una línea en las arterias no dañadas, se considera que el área de la íntima es 0 y que la relación I/M y el porcentaje de estenosis también son 0. **(C)** Cuantificación de la relación I/M en las condiciones de daño indicadas. Los datos están representados como medias±SEM. Los ratones utilizados por grupo fueron: 7 salinos, 13 AngII, 7 CsA+AngII, 5 CsA y 10 no dañados. *p<0,05 vs control; # p<0,05 vs AngII. Los resultados mostrados proceden de la unión de dos experimentos independientes.

3.2. La CN es un mediador de la formación de AAA inducidos por AngII

Un remodelado masivo de la arteria es también un distintivo de lo que sucede durante la formación y progresión de los AAA (Heeneman et al., 2007). Estudios previos han establecido que la infusión de AngII promueve la formación de AAA en ratones *Apoe*^{-/-} (Daugherty and Cassis, 2004; Daugherty et al., 2000). Para determinar el papel de la CN en la formación de AAA por AngII, iniciamos el tratamiento de ratones *Apoe*^{-/-} con CsA un día antes de la infusión de AngII y mantuvimos ambos tratamientos durante 28 días. El análisis de la formación de AAA en estos ratones mostraba que mientras que el 79% de

Resultados

los animales infundidos solo con AngII desarrollaban AAA, solo el 11% de los animales infundidos además con CsA desarrollaban esta patología (Fig. 19A-D). Esto indicaba que el tratamiento con CsA protegía del desarrollo de AAA inducido por AngII en estos animales.

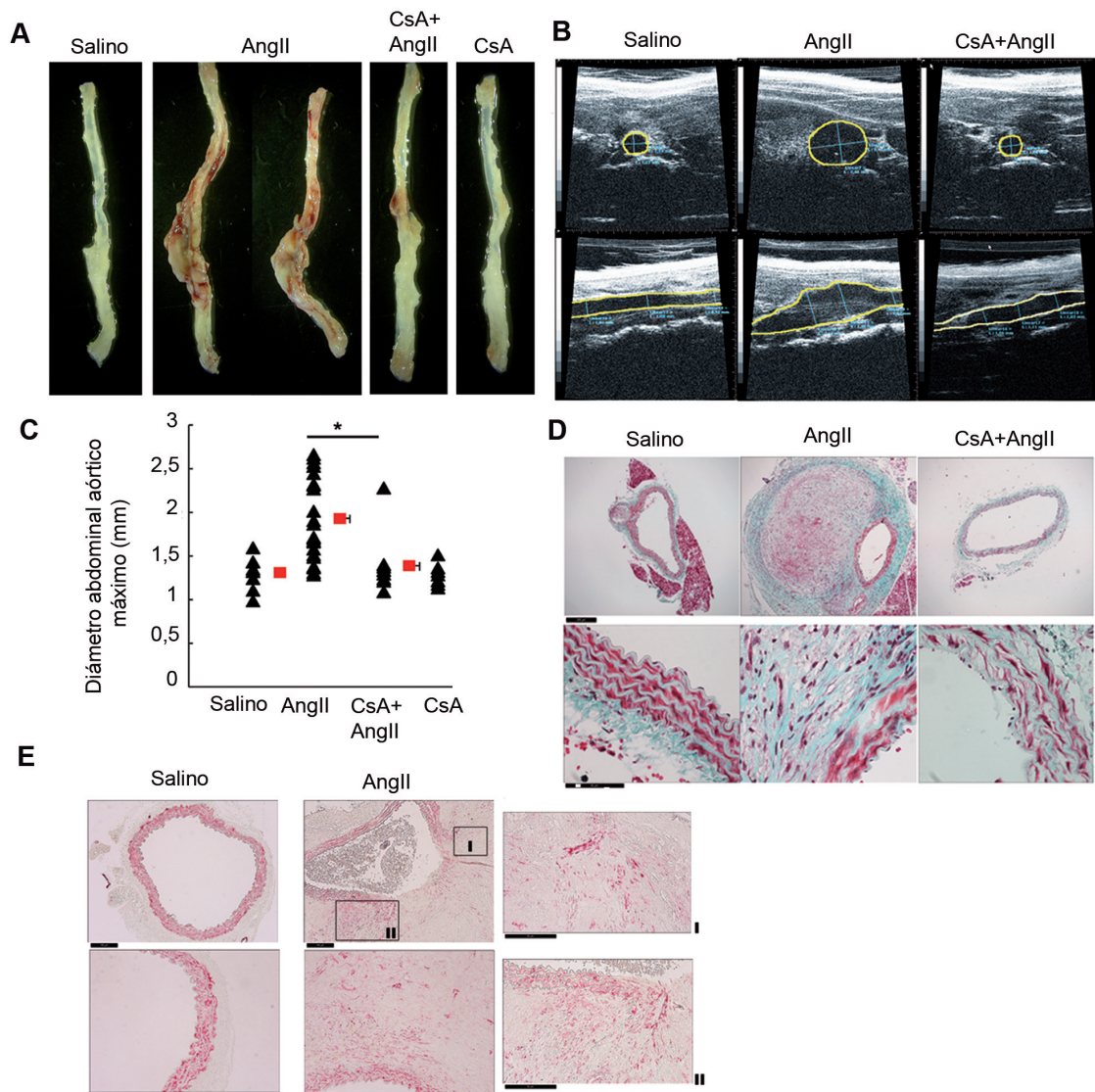


Figura 19. CsA inhibe el desarrollo de AAA inducido por AngII. Ratones *Apoe*^{-/-} fueron infundidos con CsA (5 mg/kg/d) un día antes de comenzar el tratamiento con AngII (1 µg/kg/d) durante 28 días. **(A)** Imágenes representativas de aorta completa de animales tratados según se indica. **(B)** Imágenes representativas de ultrasonido de alta frecuencia de aorta abdominal tomadas en transversal (paneles superiores) y en longitudinal (paneles inferiores) a la altura de la aorta suprarrenal. Las líneas amarillas delimitan el lumen arterial. **(C)** Diámetros abdominales aórticos máximos medidos en mm en imágenes tomadas de forma transversal. Los triángulos y cuadrados representan animales individuales y medias ± SEM, respectivamente. El número de ratones por grupo utilizado fue de 9 salinos, 24 AngII, 9 AngII+CsA y 7 CsA. *p < 0,05. **(D)** Imágenes representativas de tinción con Tricrómico de Masson en secciones de aorta abdominal al nivel suprarrenal. Escala: 200 µm (paneles superiores); 50 µm (paneles inferiores). **(E)** Imágenes representativas de IHQ para SMA en secciones de aorta abdominal a nivel suprarrenal. Escala: 100 µm (paneles superiores), 50 µm (panel de abajo y paneles I y II). Los resultados mostrados son sumatorio de dos experimentos independientes y representativos de cuatro realizados.

Las imágenes de ecografía de ultrasonidos (Fig. 19B) nos permitieron obtener información del desarrollo de la patología a lo largo del tiempo de tratamiento. Pudimos observar que mientras que AngII provocaba un notable aumento del diámetro arterial, el pretratamiento con CsA evitaba la dilatación de la arteria haciendo que estos vasos se mantuvieran con valores similares a los de los animales control (Fig. 19B, C). Tinciones de tejido aórtico con Tricrómico de Masson mostraron que la administración de CsA inhibía los cambios a nivel global de la morfología normal de la arteria inducidos por AngII (Fig. 19D paneles superiores). Además, CsA prevenía la desestabilización de la estructura arterial inducida por AngII, manteniendo la organización en capas de la pared (Fig. 19D paneles inferiores). Todos estos datos, indicaban que CsA evitaba los cambios que AngII inducía en la morfología de la pared abdominal aórtica, bloqueando el incremento del diámetro de la arteria, reduciendo la deposición de colágeno en las paredes e impidiendo la desestabilización de la estructura ordenada en multicapas de la arteria. Por otra parte, pudimos observar que el tratamiento solo con CsA no producía cambios significativos ni en la estructura ni en el diámetro máximo de la arteria (Fig. 19A-D). Como ha sido remarcado anteriormente, en esta patología existe un remodelado masivo basado en migración y proliferación de CMLVs entre otros factores (Ailawadi et al., 2009). Curiosamente, vimos que en la adventicia había gran cantidad de células positivas para α -actina de músculo liso (SMA⁺) que mostraban una distribución compatible con la movilización y proliferación de las células de la capa media hacia la adventicia (Fig. 19E, paneles EI y EII).

Para confirmar la implicación de CN en el desarrollo de AAA inducido por AngII utilizamos los lentivirus que codifican para los péptidos LxVP silvestre o mutado fusionados a GFP (lentivirus LxVP) mencionados anteriormente. Estos virus fueron inyectados de forma sistémica en la yugular de animales *Apoe*^{-/-} un mes antes de la infusión con AngII. Como pudimos observar en las IHQ específicas para GFP, este tipo de administración conseguía una gran eficiencia de transducción de las células de la pared vascular (Fig. 20A). Los resultados obtenidos indicaban que la expresión de LxVP, pero no la de su versión mutada, inhibía completamente la formación de AAA inducida por AngII (Fig. 20B). Además, los animales infectados con LxVP mostraban arterias de aspecto similar a las arterias controles sin aparente desorganización de la estructura en capas de la pared (Fig. 20C).

Por otra parte, utilizando la técnica de southwestern describimos que mientras que las formas activas de NFAT eran abundantes en secciones de aneurismas de ratones infundidos con AngII, apenas fueron detectadas en secciones de aortas de animales pretratados con CsA o infectados con LxVP (Fig 20D). Todos estos resultados establecieron una clara relación entre la activación de la ruta CN/NFAT por AngII y el consecuente desarrollo del AAA.

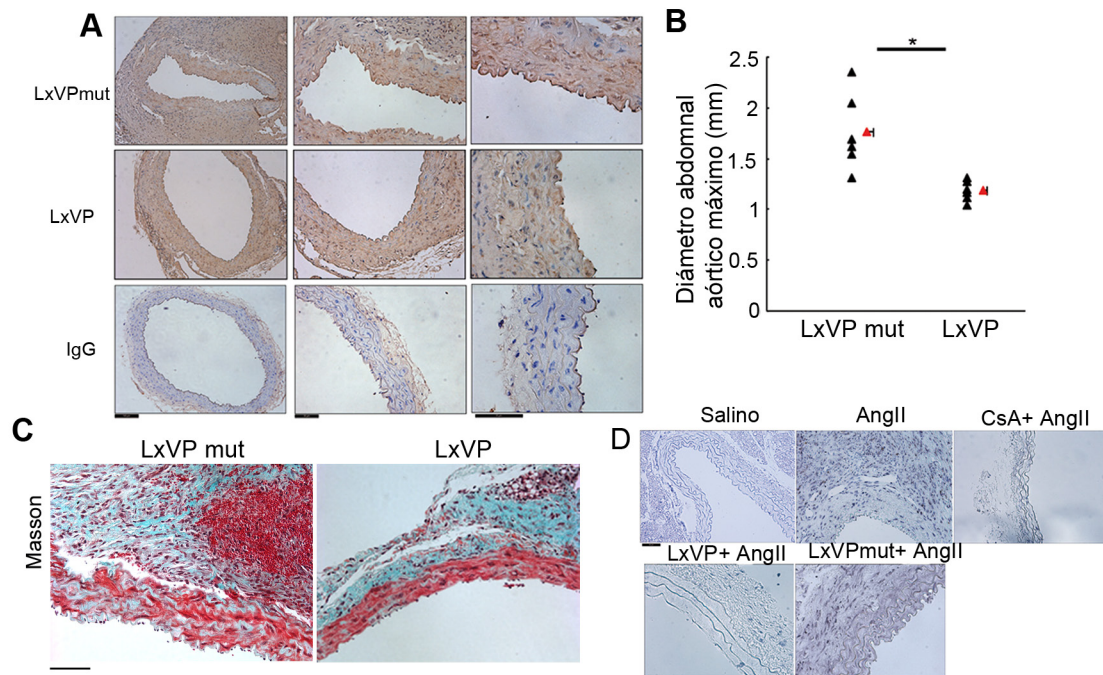


Figura 20. La administración sistémica de lentivirus LxVP inhibe el desarrollo de AAA inducido por AngII. Ratones *Apoe^{-/-}* fueron inoculados con 100 μ l de solución de lentivirus GFP-unido a LxVP o LxVPmut (10^9 partículas/100 μ l) por vía intrayugular un mes antes de la administración de AngII (1 μ g/kg/min). **(A)** IHQ para GFP en secciones aórticas de animales infectados con lentivirus LxVPmut o con LxVP. Escala: 100 μ m (panel de la izquierda), 50 μ m (panel central y derecho). Se muestra las imágenes de un ratón representativo de 6 animales independientes analizados. **(B)** Diámetros aórticos máximos medidos en mm en imágenes tomadas de forma transversal en la aorta abdominal suprarrenal. Los triángulos negros y rojos representan animales individuales y medias \pm SEM, respectivamente. * $p < 0,05$. **(C)** Imágenes representativas de Tricrómico de Masson en secciones de aorta abdominal suprarrenal **(D)** Imágenes representativas (6 animales por grupo) de análisis de southwestern con sonda de NFAT en secciones aórticas de ratones tratados como se indica. Escala, 50 μ m.

4. Identificación de genes regulados por el eje AngII/CN en CMLVs

Con el objetivo de investigar el mecanismo por el que CN media la inducción del daño vascular, nos propusimos identificar genes regulados por AngII y sensibles a CsA en CMLVs. Para este fin, analizamos los perfiles de expresión de ARN de CMLVs estimuladas con AngII y/o CsA empleando arrays de genoma completo de ratón y observamos que más de 1500 genes modificaban su expresión tras la estimulación de las CMLVs durante 4h con AngII. Los perfiles de expresión de ARN analizados por GEDI (*Gene Expression Dynamics Inspector*) (Eichler et al., 2003) mostraron que algunos de estos genes aumentaban su expresión (colores cálidos/rojos) mientras otros la disminuían (colores fríos/azules) (Fig. 21A). En cambio, el tratamiento solo con CsA apenas afectaba al transcriptoma (Fig.

21A). Sorprendentemente, la células que fueron pretratadas con CsA y posteriormente estimuladas con AngII, presentaban un nivel de regulación muy parecido a las tratadas solo con AngII (Fig. 21A). De hecho, solo 11 genes de los más de 1500 regulados por AngII eran sensibles al tratamiento con CsA (Fig. 21A-B). Esto sugería que existía una acción muy específica por parte de la ruta de CN en respuesta a AngII. De estos 11 genes, solo uno de ellos, *Rcan1*, era inhibido >70% por CsA, lo que indicaba que era un candidato importante como posible mediador del daño vascular inducido por AngII y CN en CMLVs.

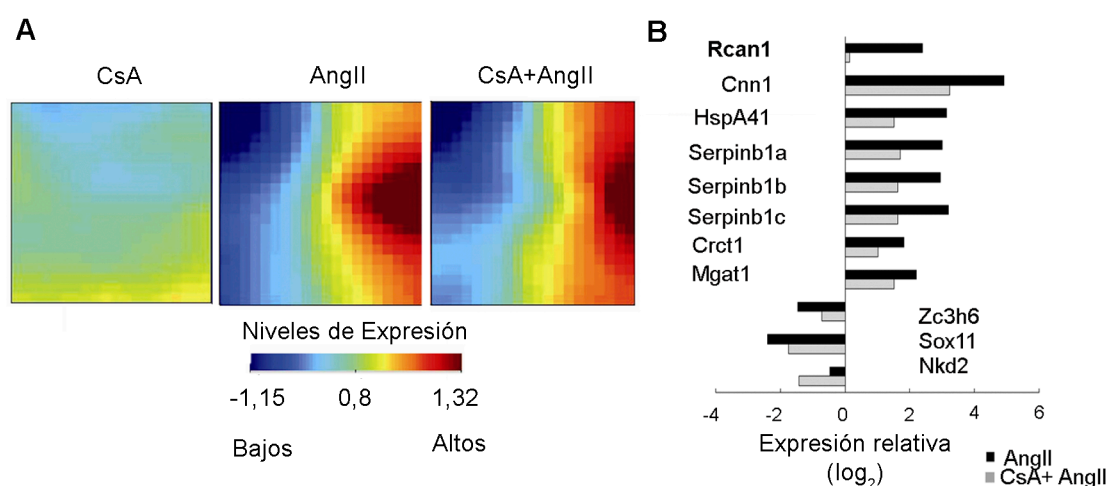


Figura 21. AngII induce una respuesta sensible a CsA muy específica en CMLVs. CMLVs fueron estimuladas con AngII (10^{-6} M) durante 4 h después de un pretratamiento con CsA (200 ng/ml) durante 1 h, y el ARN fue obtenido con Tripure e hibridado con el array. **(A)** Los mosaicos (obtenidos del análisis con GEDI) representan los patrones de expresión génica de las CMLVs en respuesta al estímulo indicado; los pixeles representados en colores amarillos/verdes indican genes que apenas varían respecto al control, los pixeles de colores cálidos (rojos) indican genes inducidos y los pixeles de colores fríos (azules) indican genes inhibidos con respecto al control. **(B)** La gráfica representa los 11 genes que son modulados por CsA ($p < 0,05$ AngII vs Cs+AngII). Los valores muestran la expresión relativa al control (\log_2) ($p < 0,05$ vs control).

4.1. AngII induce la expresión de *Rcan1* en CMLVs vía activación de CN

Para validar los resultados obtenidos en el rastreo genómico, estimulamos CMLVs de ratón con AngII a diferentes tiempos (1-8 h) y evaluamos el efecto de CsA en el patrón de expresión de *Rcan1*. Mediante PCR cuantitativa (qPCR) mostramos la inducción de la isoforma *Rcan1-4* tras 1 h y 4 h de estimulación con AngII en CMLVs de ratón y que esta inducción no tenía lugar en presencia de CsA (Fig. 22A). Estos mismos resultados fueron corroborados en CMLVs de rata (Fig. 22B), demostrando que la regulación de la forma inducible de *Rcan1* no era exclusiva de ratón. A nivel de proteína, vimos como *Rcan1-4* se inducía notablemente por AngII, alcanzando los niveles máximos entre 2-4 horas, y que su inducción era también sensible a CsA (Fig. 22C). En estos experimentos observamos que la expresión de la isoforma *Rcan1-1* era constitutiva en estas células (Fig. 22C).

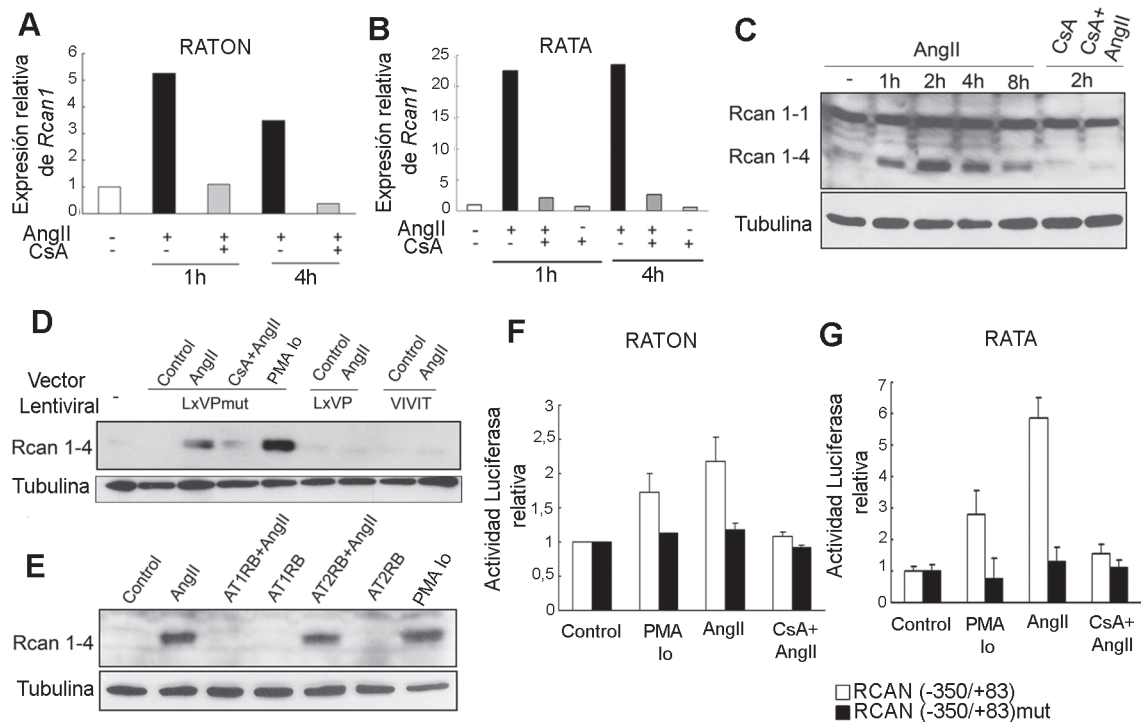


Figura 22. AngII induce la expresión de Rcan1-4 en CMLVs de forma dependiente de CN. (A-B)

Experimentos representativos (n=5) de qPCR para analizar la expresión de ARNm de *Rcan1* en muestras de CMLVs de ratón (A) y rata (B) estimuladas con AngII 1 h y 4 h con 10^{-6} M (ratón) y 10^{-5} M (rata). Las cantidades de ARNm fueron normalizadas con la expresión del gen endógeno *Tbp* y los datos se muestran relativos al control de células no estimuladas. (C) Inmunoblot de Rcan1 con extractos de CMLVs tratadas con los estímulos y durante los tiempos indicados. (D) Inmunoblot de Rcan1 que muestra Rcan1-4 en extractos de CMLVs infectadas con lentivirus GFP-LxVP o LxVPmut y tratadas como se indica. (E) Inmunoblots de Rcan1-4 con extractos de CMLVs estimuladas con AngII y tratadas con inhibidores de los receptores AT_1 (AT_1RB) y AT_2 (AT_2RB). La estimulación con una combinación de PMA Io se usó como control positivo. (C-E) La expresión de tubulina se utilizó como control de carga. Se muestran experimentos representativos de 4-6 experimentos realizados. (F-G) Actividad luciferasa relativa en CMLVs de ratón y rata, respectivamente, transfectadas con los reporteros dirigidos por los fragmentos silvestre y mutado indicados del promotor de *Rcan1-4* y tratadas como se indica. PMA Io se usó como control positivo. Los valores son la media \pm SEM de determinaciones de luciferasa hechas por triplicado en cada condición de 5 experimentos realizados.

Finalmente, describimos que la inducción de Rcan1-4 por AngII también era bloqueada en CMLVs que expresaban los péptidos LxVP o VIVIT mediante infección lentiviral (Fig. 22D). Mediante el uso de antagonistas de los receptores de AngII, describimos que la activación de Rcan1-4 en estas células también se efectuaba a través del receptor AT_1 , ya que el bloqueo de éste y no el de AT_2R impedía su inducción (Fig. 22E).

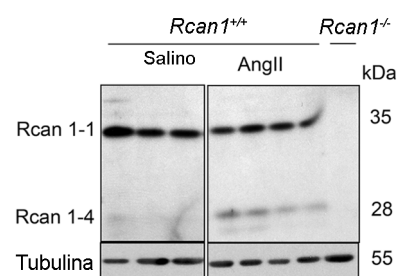
Para confirmar la participación de la vía CN/NFAT en la inducción de *Rcan1-4* por AngII, también se llevaron a cabo ensayos reporteros de luciferasa con el promotor interno específico de *Rcan1*. CMLVs de ratón se transfectaron con vectores reporteros

de luciferasa bajo el control del promotor interno silvestre de *Rcan1* (RCAN (-350/+83) o del promotor con la secuencia de interacción de NFAT mutada (RCAN(-350/+83) mut; Minami et al., 2004). AngII inducía la activación del promotor silvestre, pero no del mutado y esta activación no tuvo lugar en presencia de CsA (Fig. 22F). En CMLVs de rata también se demostró la activación de *Rcan1-4* con el promotor silvestre, pero no con el mutado (Fig. 22G). El nivel de activación del promotor de *Rcan1* por AngII era similar o incluso superior al alcanzado con la combinación de PMA Io (Fig. 22F) usada como control positivo y previamente descrito (Cano et al., 2005). Estos datos sugerían que la unión de NFAT al promotor interno de *Rcan1* es esencial para la activación de este gen por AngII, y por tanto apoyan, que la inducción de *Rcan1-4* por AngII está mediada por la activación de la ruta CN/NFAT.

FUNCIONES DEL REGULADOR DE CN RCAN1

Puesto que *Rcan1* es el gen inducido por AngII más dependiente de CN en CMLVs, nos propusimos analizar si este gen era el mediador principal de las funciones biológicas de la activación de CN en respuesta a AngII. Para este fin, utilizamos CMLVs y ratones deficientes en *Rcan1* (*Rcan1*^{-/-}) (Porta et al., 2007). Estos ratones se diseñaron para delecionar ambas isoformas de *Rcan1*, como comprobamos en extractos de tejido aórtico (Fig. 23).

Figura 23. Los ratones *Rcan1*^{-/-} pierden la expresión de las dos isoformas. AngII (1 µg/kg/min) fue administrada de forma sistémica en ratones C57BL/6 durante 14 d por medio de minibombas osmóticas. Inmunoblot de *Rcan1* con extractos de aorta procedentes de animales *Rcan1*^{+/+} y *Rcan1*^{-/-} (un animal por carril).



1. *Rcan1* es un mediador central en la inducción de migración de CMLVs por AngII

Puesto que CN regula la migración de CMLVs en respuesta a AngII y que *Rcan1* podría ser el principal mediador de las funciones biológicas de CN en CMLVs en respuesta a este estímulo, nos propusimos analizar la contribución de *Rcan1* en la migración de estas células. Para ello utilizamos CMLVs procedentes de animales deficientes en *Rcan1* y examinamos su efecto en la migración inducida por AngII. Encontramos que mientras que las células *Rcan1*^{+/+} migraban hacia el estímulo de AngII o suero (FBS), las células *Rcan1*^{-/-} también

lo hacían hacia suero, pero no hacia AngII (Fig. 24A-B). Estos datos sugerían que la inducción de la migración de las CMLVs por AngII requiere de la presencia de Rcan1. Para confirmar estos resultados realizamos ensayos de cierre de herida y observamos que las CMLVs *Rcan1*^{+/+} ocupaban la zona denudada en presencia de AngII más eficientemente que las células *Rcan1*^{-/-} (Fig. 24C). Además, la reconstitución de la expresión de la isoforma inducible Rcan1-4 mediante infección con adenovirus (AdGFP-Rcan1-4) rescataba la respuesta migratoria de las células *Rcan1*^{-/-} hacia AngII (Fig. 24D-E).

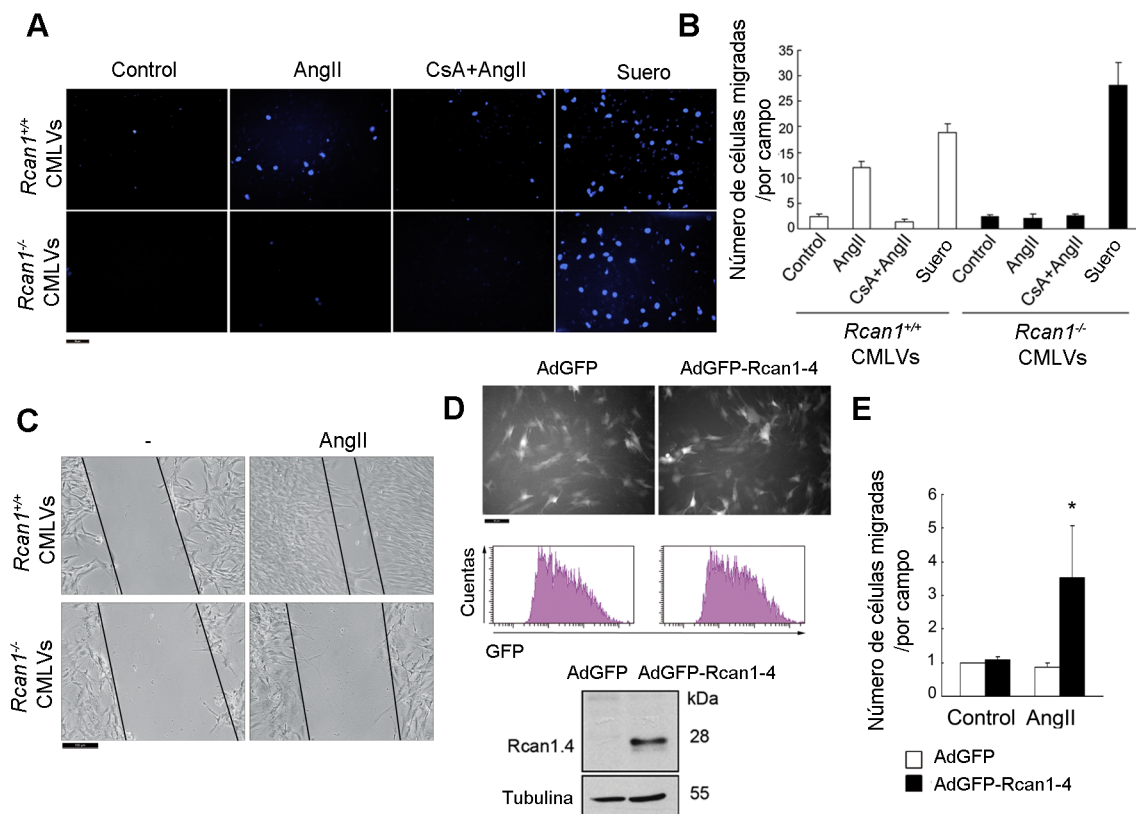


Figura 24. Rcan1 es necesario para la inducción de la migración de CMLVs por AngII. (A - B).

CMLVs de ratón fueron sembradas en la parte superior de una membrana porosa de transwell. En la cámara inferior se añadieron AngII (10^{-6} M), AngII (10^{-6} M) + CsA (200 ng/ml) o 10% FBS como estímulos. Después de 4 h, las células no migradas se limpiaron y la membrana se tiñó con Hoechst. **(A)** Imágenes representativas de la superficie de las membranas de los transwell. Escala, 50 μ m. **(B)** Cuantificación de las CMLVs migradas en 10 campos al azar por condición en un experimento representativo de 6-7 realizados por triplicado (media \pm SEM). **(C)** Imágenes representativas de ensayos de cierre de herida de 4 experimentos realizados en CMLVs *Rcan1*^{+/+} y *Rcan1*^{-/-} tratadas como se indica. Las líneas marcan el límite de la herida después de 4 horas. Escala, 100 μ m. **(D)** Fotografías representativas de fluorescencia de GFP en CMLVs *Rcan1*^{-/-} infectadas con adenovirus para expresar GFP (AdGFP) o GFP fusionado a Rcan1-4 (AdGFP-Rcan1-4). Escala, 50 μ m. Los histogramas muestran el análisis mediante citometría de flujo de la expresión de GFP en estas células. Inmunoblot de Rcan1 y Tubulina con extractos de CMLVs *Rcan1*^{-/-} infectadas con AdGFP o AdGFP-Rcan1-4. **(E)** Cuantificación de las CMLVs *Rcan1*^{-/-} infectadas, migradas y tratadas como se indica. Las células se cuentan en 10 campos por condición. Los datos están representados como media \pm SEM de 3 experimentos (*p<0,05 vs control).

2. Papel de Rcan1 en remodelado vascular inducido por AngII

Dado que Rcan1 es necesario para la migración de las CMLVs en respuesta a AngII y que la CN tiene un papel central en el remodelado de la pared vascular implicado en el desarrollo de AAA y en la formación de neoíntima, nuestro siguiente objetivo fue analizar el papel potencial de Rcan1 en estos procesos de remodelado patológico.

2.1. Rcan1 participa en la formación de neoíntima

En primer lugar analizamos la expresión de Rcan1 en el modelo de daño femoral. Observamos que Rcan1 se encontraba expresado en secciones de tejido lesionado procedente de arterias femorales sometidas a un proceso de daño mecánico con catéter y tratamiento con AngII (Fig. 25A). La mayoría de las células que expresaban altos niveles de Rcan1 se encontraban en la capa media, aunque también se observó expresión en células de la neoíntima (Fig. 25A). El estudio de ratones *Rcan1*^{-/-} demostró que estos, eran completamente resistentes a la formación de neoíntima inducida por el catéter y el tratamiento con AngII (Fig. 25B), reflejado en los valores de relación I/M (Fig. 25C) y los niveles de estenosis ($2,62 \pm 2,5\%$), ambos cercanos a los niveles basales. Todos estos datos sugerían que AngII exacerbaba la formación de neoíntima durante el daño a través de la activación de CN y la inducción de la expresión de Rcan1-4 principalmente en CMLVs.

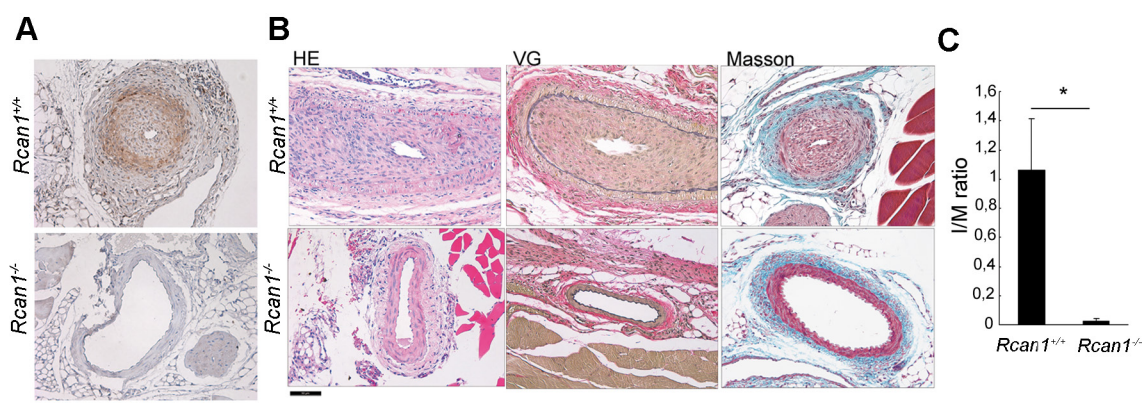


Figura 25. Rcan1 media la formación de neoíntima inducida por AngII. La arteria femoral derecha fue dañada por medio de la introducción de un catéter y la posterior administración de AngII (0,5 µg/kg/min) durante 14 d en animales *Rcan1*^{+/+} y *Rcan1*^{-/-}. **(A)** Imágenes representativas de IHQ de Rcan1 en secciones de arterias femorales dañadas y tratadas con AngII procedentes de ratones *Rcan1*^{+/+} y *Rcan1*^{-/-} (n=5/grupo). Escala, 50 µm **(B)** Imágenes representativas (8-11 ratones) de tinciones con HE, Van Giensson (VG), y Tricrómico de Masson (Masson) en secciones de arteria femoral procedentes de animales *Rcan1*^{+/+} y *Rcan1*^{-/-} tratados con AngII. Escala, 50 µm. **(C)** Cuantificación de la relación I/M (media ± SEM; *p<0,05) en los ratones *Rcan1*^{+/+} (n=8) y *Rcan1*^{-/-} (n=11). Los resultados proceden de dos experimentos independientes.

2.2. La ausencia de Rcan1 previene la formación de AAA

Posteriormente, propusimos analizar el papel de Rcan1 en el modelo de AAA por infusión de AngII. En un análisis histológico de muestras de AAA observamos que aunque la expresión de Rcan1 era detectable mediante IHQ e IF en la capa media de la aorta en animales *Apoe*^{-/-} no tratados, su expresión aumentaba notablemente tanto en células de la túnica media como de la adventicia en secciones de AAA de ratones infundidos con AngII (Fig. 26A-B). El análisis de Rcan1 en extractos de tejido aórtico mediante inmunoblot también mostró un claro incremento de la expresión de Rcan1-4 en tejido de AAA comparado con tejido no lesionado de la zona torácica (Fig. 26A inmunoblot).

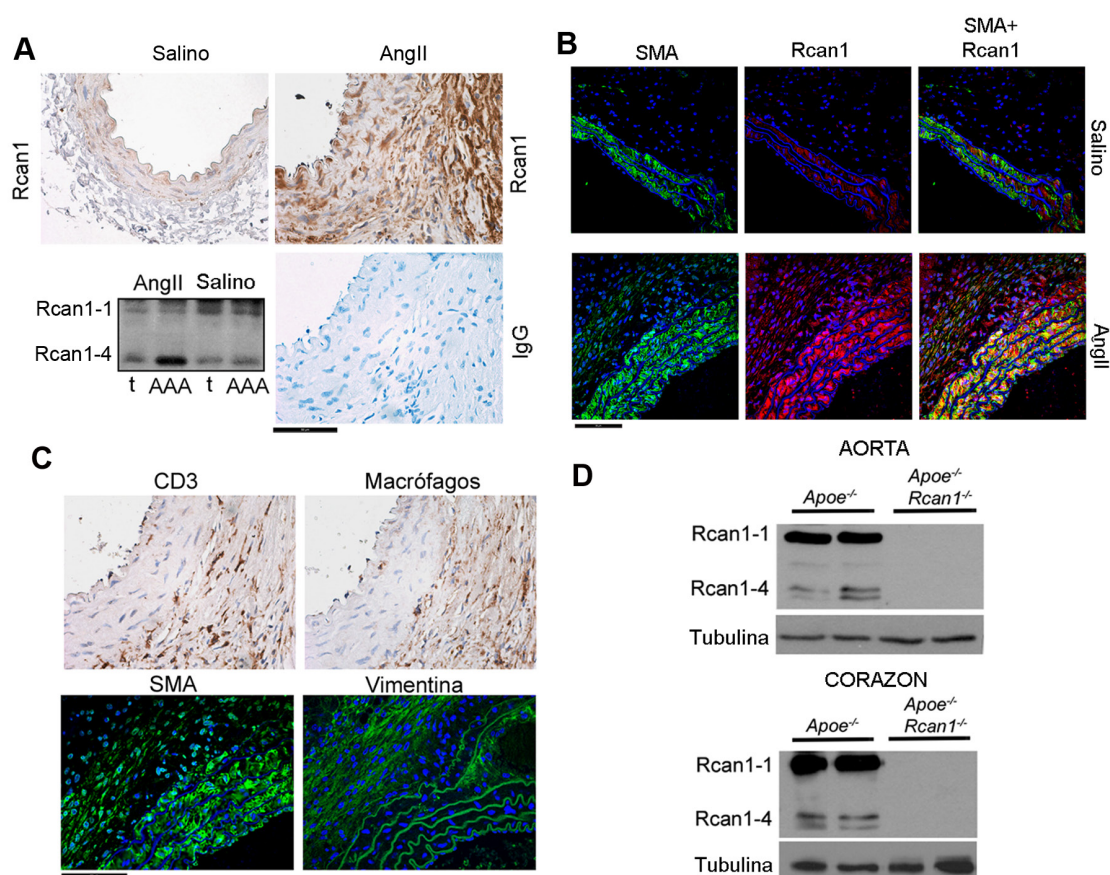


Figura 26. La expresión de Rcan1 es inducida en AAA. Ratones *Apoe*^{-/-} fueron infundidos con AngII (1 µg/kg/m) durante 28 días. **(A)** IHQ de Rcan1 (paneles superiores) o con IgG inespecíficas (panel inferior) en secciones de aorta abdominal de animales *Apoe*^{-/-} tratados con salino o con AngII (presentan AAA). Escala, 50 µm. Inmunoblot de Rcan1-4 con extractos de aorta torácica y del segmento de AAA en ratones *Apoe*^{-/-}. **(B)** Imágenes representativas de microscopía confocal de IF de Rcan1 y SMA en secciones de aorta abdominal de ratones *Apoe*^{-/-} tratados con salino (paneles superiores) o con AngII (paneles inferiores). Las imágenes son proyecciones máximas de una serie completa de planos en z. La unión de los dos canales también se muestra. Estas imágenes corresponden a un experimento de 5 realizados en ratones independientes. Escala, 50 µm. **(C)** Imágenes representativas de IHQ e IF de CD3, Mac3, SMA, y vimentina en secciones de AAA de animales *Apoe*^{-/-} tratados con AngII. **(D)** Inmunoblots de Rcan1 y Tubulina con extractos de tejidos procedentes de aorta y corazón de animales *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (un animal por carril). El dato es representativo de un total de 5 animales por grupo.

El estudio de las células presentes en la capa media y en la adventicia de tejido de AAA reveló que, muchas de las células presentes en la adventicia expresaban SMA, expresión que estaba restringida a la capa media en tejido control (Fig. 26B). Asimismo, en la adventicia también encontramos células positivas para vimentina (fibroblastos), CD3⁺ (Linfocitos) y Mac3⁺ (macrófagos) (Fig. 26C). Para investigar si Rcan1 está involucrado en la formación de aneurismas, establecimos una línea de ratones deficientes en Apoe y Rcan1, mediante el cruce de ratones *Apoe*^{-/-} con ratones *Rcan1*^{-/-}. Los ratones *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-}, como ocurría con los ratones *Rcan1*^{-/-}, no expresaban ninguna de las isoformas de Rcan1, como quedó confirmado al analizar mediante inmunoblot su expresión en extractos de aorta y corazón (Fig. 26D). Al cabo de un mes de infusión de AngII se observó que mientras que los animales *Apoe*^{-/-} desarrollaban un 89% de AAA en presencia de AngII, con aumento del lumen de la aorta y con un remodelado extensivo del vaso, los animales *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} eran resistentes a desarrollarlos, presentando lumen y morfología indistinguibles de los de los animales no tratados (Fig. 27).

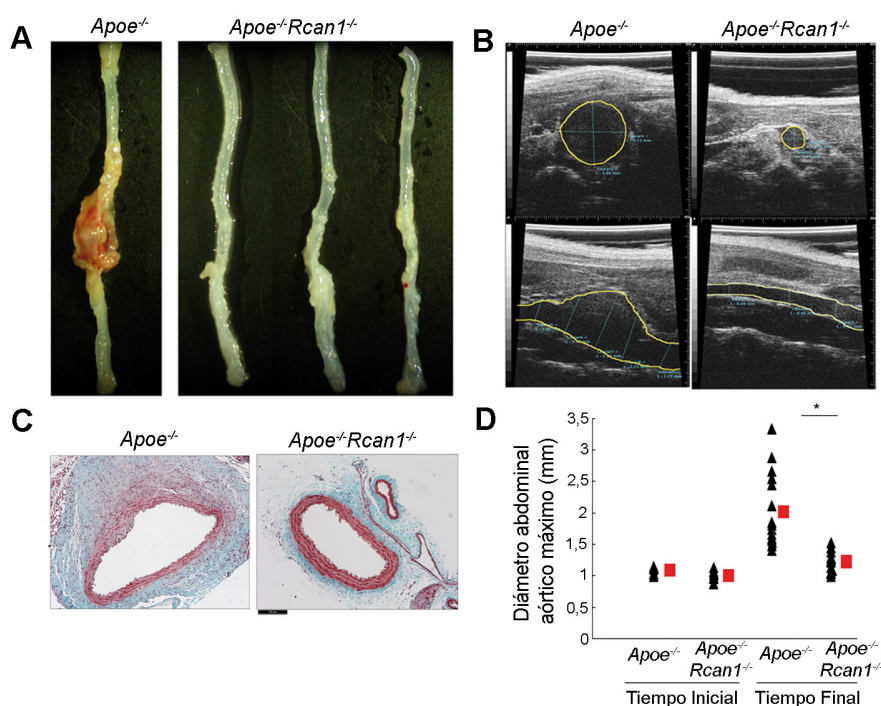


Figura 27. Rcan1 participa en la formación de AAA inducida por AngII. Ratones *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} fueron infundidos con AngII (1 µg/kg/min) durante 28 días. **(A)** Imágenes representativas de aorta completa de ratones tratados con AngII. **(B)** Imágenes de ultrasonido mostrando el lumen arterial en secciones transversales (paneles superiores) y longitudinales (paneles inferiores) de la aorta a nivel suprarrenal de animales infundidos con AngII. Las líneas amarillas delimitan el lumen arterial. **(C)** Secciones de aorta abdominal teñidas con Tricrómico de Masson. Escala, 100 µm. **(D)** Diámetros máximos de la aorta abdominal suprarrenal medidos en mm en imágenes de secciones transversales al principio y al final del tratamiento con AngII. Los triángulos y cuadrados representan animales individuales y medias±SEM, respectivamente. *Apoe*^{-/-} (n=16), *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (n=15). *p<0,05.

El estudio longitudinal por ecografía mostraba un aumento significativo del diámetro aórtico máximo en los ratones *Apoe*^{-/-}, mientras que este diámetro presentaba valores normales en los *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (Fig. 27B, D). A nivel histológico, describimos un complejo remodelado de la pared vascular en los ratones *Apoe*^{-/-} con fibrosis y en ocasiones trombos (Fig. 27C). En cambio, las secciones aórticas de los ratones *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} mostraban un aspecto normal (Fig. 27C).

3. Papel de *Rcan1* en remodelado vascular aterosclerótico

Habiendo observado que *Rcan1* regula algunos de los procesos básicos y esenciales en la formación de neoíntima en un modelo de restenosis y en el desarrollo de AAA, decidimos analizar si *Rcan1* también tenía un papel fundamental en aterosclerosis, una patología vascular en la que también se produce remodelado masivo de la pared vascular y que depende de procesos de migración celular.

3.1. La expresión de *Rcan1-4* está inducida en placas de aterosclerosis humana y de ratón

Con el fin de analizar si *RCAN1* estaba sobreexpresado en lesiones de ateroma, analizamos su expresión en lesiones procedentes de aorta coronaria de pacientes intervenidos y la comparamos con la de arterias coronarias no dañadas y la de vasos que no desarrollan aterosclerosis (arterias mamarias internas). La expresión de la proteína *RCAN1-4* estaba notablemente aumentada en los vasos lesionados respecto a la observada en las arterias no lesionadas o arterias mamarias (Fig. 28A). A pesar de que la expresión de *RCAN1-1* es normalmente constitutiva, sus niveles también parecían estar elevados en arterias ateroscleróticas, comparado con las controles (Fig. 28A), si bien las diferencias no eran tan marcadas como en el caso de *RCAN1-4*. Las diferencias observadas a nivel proteico se correspondían con el aumento de expresión de ARNm de *RCAN1-1* y *RCAN1-4* en arterias con placas de ateroma (Fig. 28B).

El análisis mediante IHQ de arterias coronarias humanas con aterosclerosis confirmó que la expresión de *RCAN1* estaba aumentada comparado con vasos no dañados (Fig. 28C paneles a2 y b2 vs D). Además, la tinción de SMA y la de MØ (macrófagos) sugirió que la expresión de *RCAN1* aumentaba en zonas de la lesión ricas en CMLVs (Fig. 28C panel a1-a3) o ricas en macrófagos (Fig. 28C panel b1-b3) en ateromas humanos.

Para determinar si estos resultados podían extrapolarse a lo que ocurre en aterosclerosis en modelo de ratón, utilizamos ratones *Apoe*^{-/-} (Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992).

Estos animales desarrollan de forma espontánea placas de ateroma y la aparición de estas lesiones se acelera cuando son alimentados con dieta rica en colesterol y grasas (*high fat diet*, HFD). Como ocurre con los pacientes que presentan hipercolesterolemia familiar, estos ratones desarrollan lesiones en la zona de la válvulas aórticas (Getz and Reardon, 2012), así como en la zona del cayado aórtico, mientras que la zona torácica es menos susceptible a desarrollar estas lesiones. Analizamos la expresión de Rcan1 en válvulas aórticas de animales *Apoe*^{-/-} alimentados durante 6 semanas con HFD o con dieta normal y en las de animales silvestres C57BL/6. Observamos que el tejido de válvulas aórticas de animales *Apoe*^{-/-} alimentados con HFD mostraba una tinción de Rcan1 por IHQ muy marcada y localizada, sobretodo, en células cercanas a áreas de deposición lipídica. Sin embargo, en el caso de tejido de válvulas no lesionadas, la expresión de Rcan1 era menor (Fig. 29A, paneles superiores).

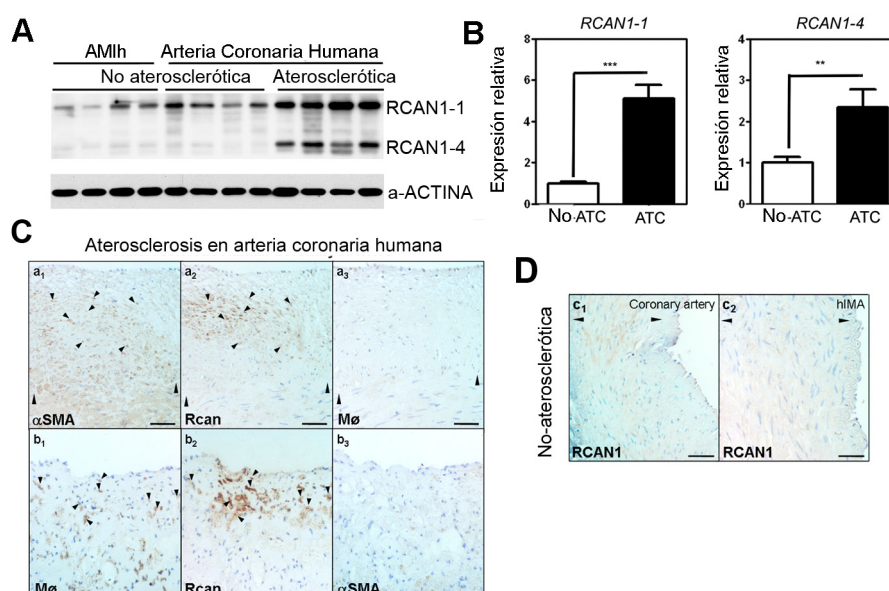


Figura 28. La expresión de RCAN1 en placas de aterosclerosis humana es elevada. (A) Inmunoblot de RCAN1 y α-ACTINA en arterias coronarias humanas ateroscleróticas o no y en arteria mamaria interna (AMIh). **(B)** Análisis mediante qPCR de la expresión de *RCAN1-1* y *RCAN1-4* en tejido aterosclerótico (ATC) y no aterosclerótico (No-ATC) de arterias coronarias humanas. Las cantidades de ARNm fueron normalizadas con el control endógeno *GAPDH* (medias±SEM). **p<0,01; ***p<0,001. **(C)** Imágenes representativas de IHQ para SMA, RCAN1 y macrófagos (MØ) en secciones seriadas de arteria coronaria humana con aterosclerosis en áreas ricas en CMLVs y falta de macrófagos (paneles de arriba a₁-a₃) y en zonas ricas en macrófagos con poca cantidad de CMLVs (panel b₁-b₃). Las puntas de flecha señalan la aparente colocalización de RCAN1 con CMLVs y macrófagos. Escala, 50 μm. **(D)** IHQ de RCAN1 en secciones de arteria coronaria humana no dañada y de arteria mamaria interna (c₁-c₂ respectivamente). Las puntas de flechas alargadas señalan lámina elástica interna. Escala, 50 μm.

Los mismos resultados se obtuvieron mediante IF, evidenciando que la expresión de Rcan1 aumentaba en tejido lesionado con respecto al tejido sano (Fig. 29A, paneles

inferiores). Además, la co-IF de Rcan1 con marcadores de tipos celulares, mostró que tanto en células endoteliales, como en CMLVs y macrófagos había elevados niveles de expresión de Rcan1 (Fig. 29B). El análisis de muestras de cayado aórtico y aorta torácica mediante qPCR señaló que había un aumento de la expresión de *Rcan1* en animales *Apoe*^{-/-} alimentados con dieta normal respecto a animales silvestres C57BL/6 y que esta expresión aumentaba aún más cuando los animales *Apoe*^{-/-} eran alimentados con HFD (Fig. 29C-D). Como ocurría en las muestras de tejido de pacientes, el análisis de expresión de proteína reveló que la isoforma Rcan1-4 estaba notablemente aumentada en ratones alimentados con HFD con respecto a los controles (Fig. 29C-D). Sin embargo, en este caso, la expresión de Rcan1-1 no estaba tan visiblemente elevada como ocurría en humanos.

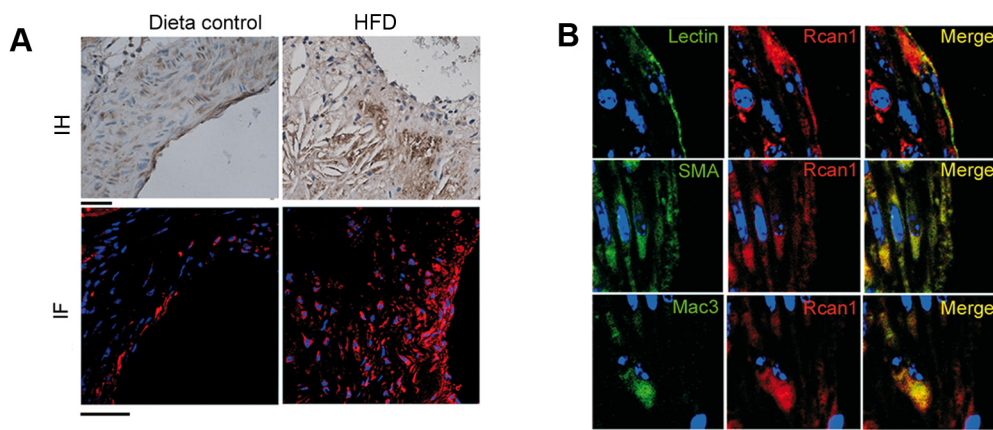
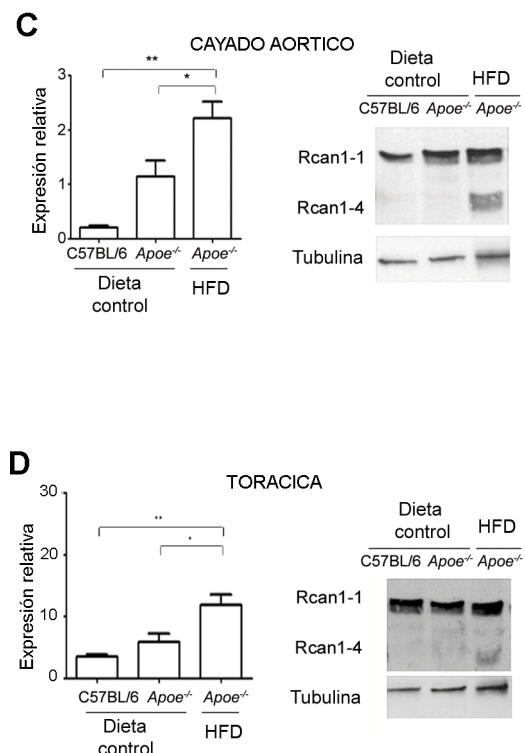


Figura 29. La expresión de Rcan1 está inducida en placas de aterosclerosis de ratón. (A) Imágenes representativas de IHQ (paneles superiores) y de IF (paneles inferiores) de Rcan1 en secciones de válvulas aórticas de ratones *Apoe*^{-/-} alimentados con dieta normal o HFD. Escala, 50 μ m. **(B)** Imágenes representativas de co-IF de Rcan1 (rojo), lectina (verde), SMA (verde) y Mac3 (verde) en seno aórtico lesionado de ratones *Apoe*^{-/-} alimentados con HFD. También se muestran imágenes de todos los canales juntos (Merge). Escala, 5 μ m. **(C-D)** Análisis de la expresión de Rcan1 mediante qPCR e inmunoblot en (C) cayado aórtico y (D) aorta torácica de ratones C57BL/6 y *Apoe*^{-/-} alimentados con dieta normal o HFD. La cantidad de ARNm fue normalizada con la expresión del control endógeno *Hprt1* (medias \pm SEM). Los resultados proceden de la unión de 3 experimentos independientes. $p < 0,05$; $p^{**} < 0,01$. La Tubulina fue usada como control de carga.



Debido a que la presencia de estímulos aterogénicos parecía aumentar la expresión de Rcan1 en tejido lesionado y a que en los primeros pasos del desarrollo de la placa de ateroma la acumulación de LDL oxidadas (LDLox) es crucial como estímulo iniciador de la patología, nos planteamos la posibilidad de que estas partículas pudieran inducir la expresión de Rcan1. Para comprobar esta hipótesis, analizamos la expresión de Rcan1 en células endoteliales, CMLVs y macrófagos y observamos que su tratamiento con LDLox inducía la expresión de ARNm de *Rcan1* y de la proteína Rcan1-4, pero no la de Rcan1-1 (Fig. 30).

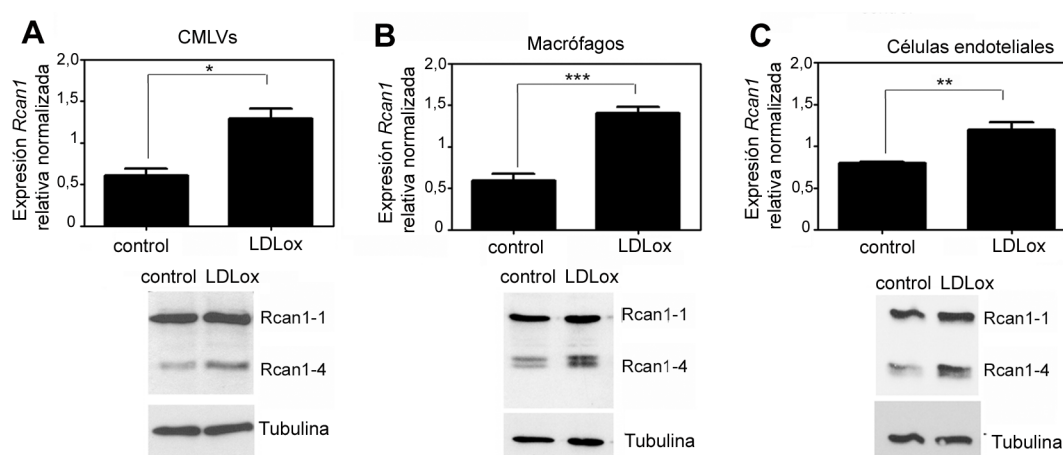


Figura 30. LDLox inducen la expresión de Rcan1-4. Análisis de la expresión de Rcan1 mediante qPCR e inmunoblot (se muestran experimentos representativos usando Tubulina como control de carga) en **(A)** CMLVs (n=3), **(B)** Macrófagos peritoneales (n=3) y **(C)** Células endoteliales (n=6) extraídas de ratones *Apoe*^{-/-} y tratadas con LDLox (50 µg/ml). Las cantidades de ARNm fueron normalizadas con la expresión del control endógeno *Hprt1* (medias ± SEM). p* < 0,05; p** < 0,01; ***p < 0,001.

3.2. La inactivación genética de Rcan1 disminuye el desarrollo de placa de ateroma

Posteriormente investigamos la contribución de Rcan1 al desarrollo de placas de ateroma. Para ello, ratones *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} fueron alimentados con HFD durante 6 semanas. Transcurrido este tiempo, las aortas fueron extraídas y teñidas con Oil Red. El análisis *en face* de esta tinción específica de lípidos con Oil Red indicó que el porcentaje de área de lesión en aorta de ratones *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} era significativamente menor que el observado en ratones *Apoe*^{-/-} (Fig. 31A). Además, el estudio histológico de secciones de tejido procedentes de válvulas aórticas y aorta ascendente de estos ratones demostró que el área de lesión de los ratones *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} también era significativamente menor en estas regiones (Fig. 31B-C). Tanto los ratones *Apoe*^{-/-} como los *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} mostraron incrementos de peso similares después de las 6 semanas

de dieta (Fig. 31D), así como concentraciones similares en suero de triglicéridos (TGA), colesterol total (CT) y libre (CL), proteína de alta densidad (HDL), y de baja densidad (LDL) (Fig. 31E-F).

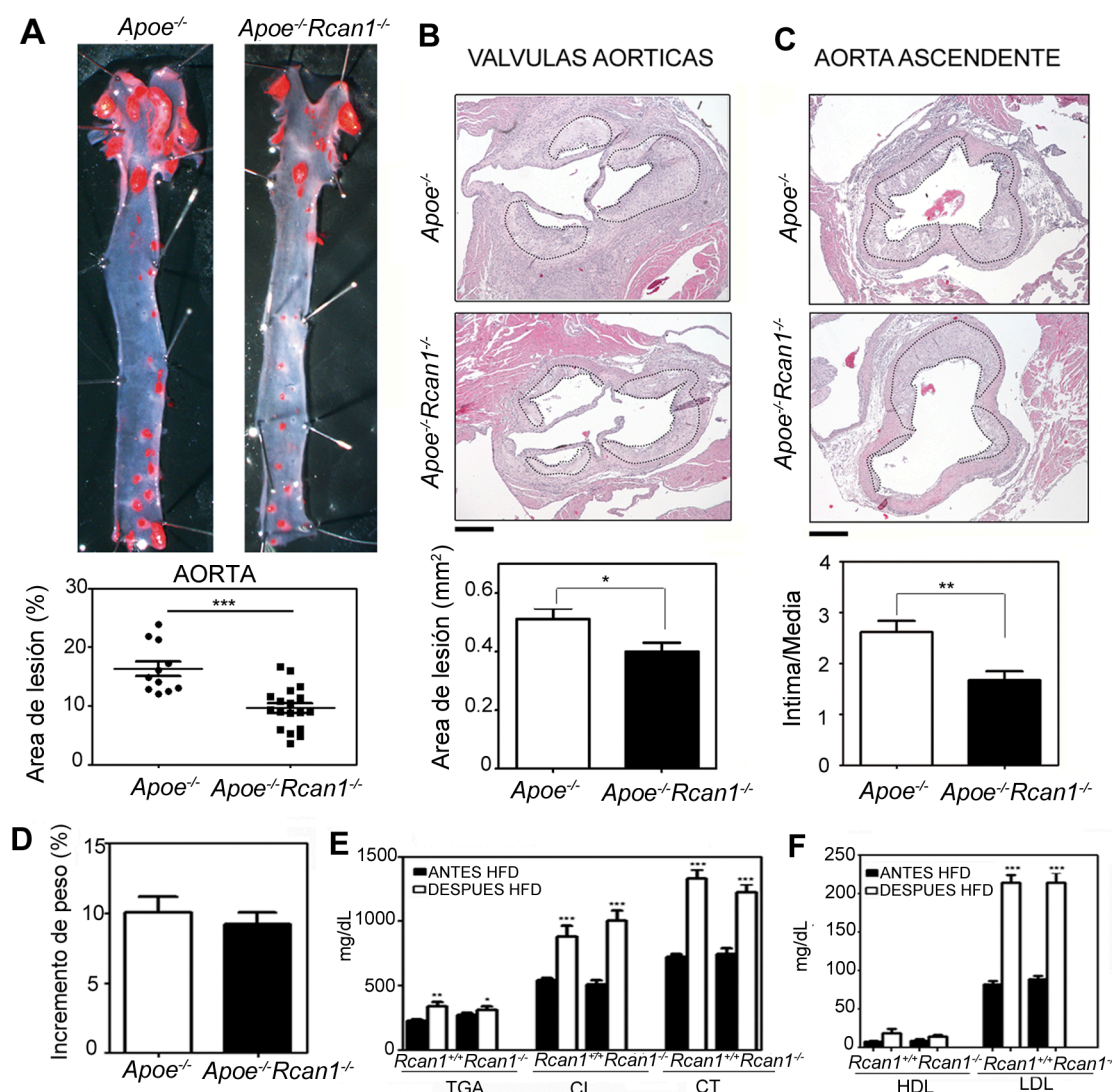


Figura 31. La ausencia de Rcan1 disminuye el porcentaje de lesión aterogénica. Ratones *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} fueron alimentados con HFD durante 6 semanas. **(A)** Imágenes representativas de tinción de Oil Red O en aorta torácica y cuantificación del porcentaje de área de lesión en aortas *Apoe*^{-/-} (n=11) y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (n=18). Cada círculo o cuadrado representa un animal y las barras horizontales representan la media (barras largas) y la SEM (barras cortas). **(B-C)** Tinciones de HE representativas de **(B)** válvulas aórticas y **(C)** aorta ascendente en la misma cohorte de animales que en A y cuantificación del **(B)** área de lesión (media ± SEM) y **(C)** de la lesión medida como la relación Intima/Media (media ± SEM). Escala, 200 µm. *p<0,05, **p<0,001, ***p<0,0001. **(D)** Incremento de peso en porcentaje (*Apoe*^{-/-}, n=12; *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-}, n=18). **(E)** Concentración de triglicéridos (TGA), colesterol libre (CL) y colesterol total (CT) en estos ratones antes y después de la dieta (media ± SEM). **(F)** Niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y de baja densidad (LDL) medidos en suero en los mismos ratones que en E. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

El análisis de la tinción de Oil Red en aortas nos permitió obtener información acerca de la extensión de las placas, pero carecía de una visión volumétrica o tridimensional de estas

lesiones. A pesar de que la estenosis del vaso es el parámetro más definitorio en clínica para analizar la efectividad de una terapia, no existía ningún método de cuantificación *ex vivo* que permitiera analizar de forma precisa y rápida el volumen o grosor de las lesiones en modelos de ratón. Nosotros diseñamos un método relativamente rápido y preciso para cuantificar en 3D las placas de ateroma al que hemos denominado *NLO-3D (NonLinear Optical 3-Dimensional Method)*. Para llevar a cabo este método se usaron las mismas aortas teñidas con Oil Red utilizadas para el análisis *en face*. Empleando microscopía confocal de dos fotones, generamos imágenes 3D en las que pudimos delimitar la forma tridimensional de estas lesiones (Fig. 32A) y calcular el volumen de las placas presentes en cayados aórticos completos mediante la detección de la señal del colágeno por la generación de segunda armónica, la señal de la autofluorescencia de la elastina y la fluorescencia del Oil Red (más información del método en *Anexo III*). Los resultados del análisis de los cayados aórticos de animales alimentados con HFD durante 6 semanas mostraron, que al igual que con el análisis del área, los ratones *Apoe^{-/-}Rcan1^{-/-}* presentaban placas de ateroma de menor volumen que los ratones *Apoe^{-/-}* (Fig. 32C), sugiriendo así que podrían presentar menor grado de estenosis arterial.

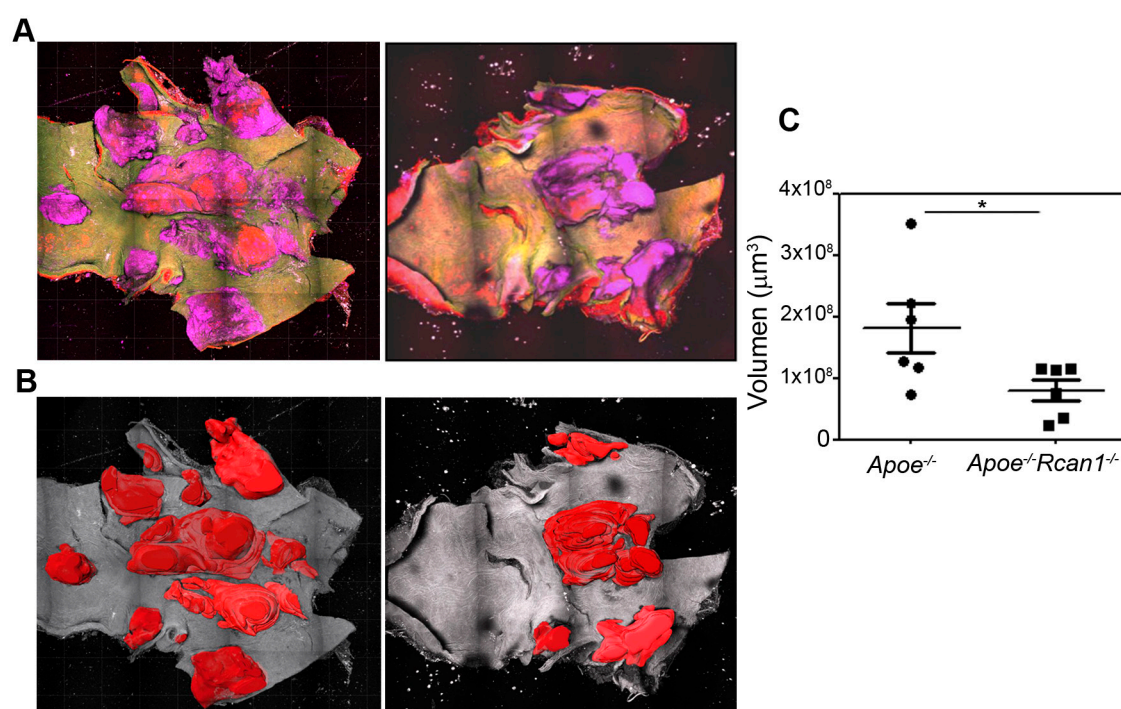


Figura 32. Análisis 3D del volumen de las placas de ateroma mediante la técnica NLO-3D. (A) Imágenes de la reconstrucción en 3D de cayados aórticos de animales *Apoe^{-/-}* y *Apoe^{-/-}Rcan1^{-/-}* alimentados con HFD durante 6 semanas. Color verde, elastina; color rojo, señal del colágeno; color rosa, señal del Oil Red. **(B)** Reconstrucciones 3D resultado del análisis con el software de imagen Imaris de las mismas aortas que en A. **(C)** Cuantificación del volumen de lesión en cayados *Apoe^{-/-}* (n=7) y *Apoe^{-/-}Rcan1^{-/-}* (n=7). Cada círculo y cuadrado representa un animal y las barras horizontales representan la media (barras largas) y la SEM (barras cortas), * $p < 0,05$.

La composición de la placa es otro de los parámetros relevantes relacionados con el grado de desarrollo de la lesión aterosclerótica. De este modo, el análisis del porcentaje de macrófagos, CMLVs y del patrón de deposición lipídica se utilizó como criterio para analizar el grado de progresión de la lesión. La determinación del contenido de macrófagos mediante tinción específica de Mac3 en válvulas aórticas, región en la cual se encuentran las lesiones más avanzadas en el modelo de *Apoe*^{-/-} (Nakashima et al., 1994), mostraba que el contenido de macrófagos en las placas *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} era menor que en las del grupo control (Fig. 33A). En cambio, el porcentaje de CMLVs (SMA⁺) era similar en ambos genotipos (Fig. 33B). Estos datos indicaban que las placas podían presentar diferente composición y que, en consecuencia, podrían encontrarse en estadios de progresión distintos. El grado de progresión de las placas de ateroma se determinó en base al método de Stary (Stary et al., 1994).

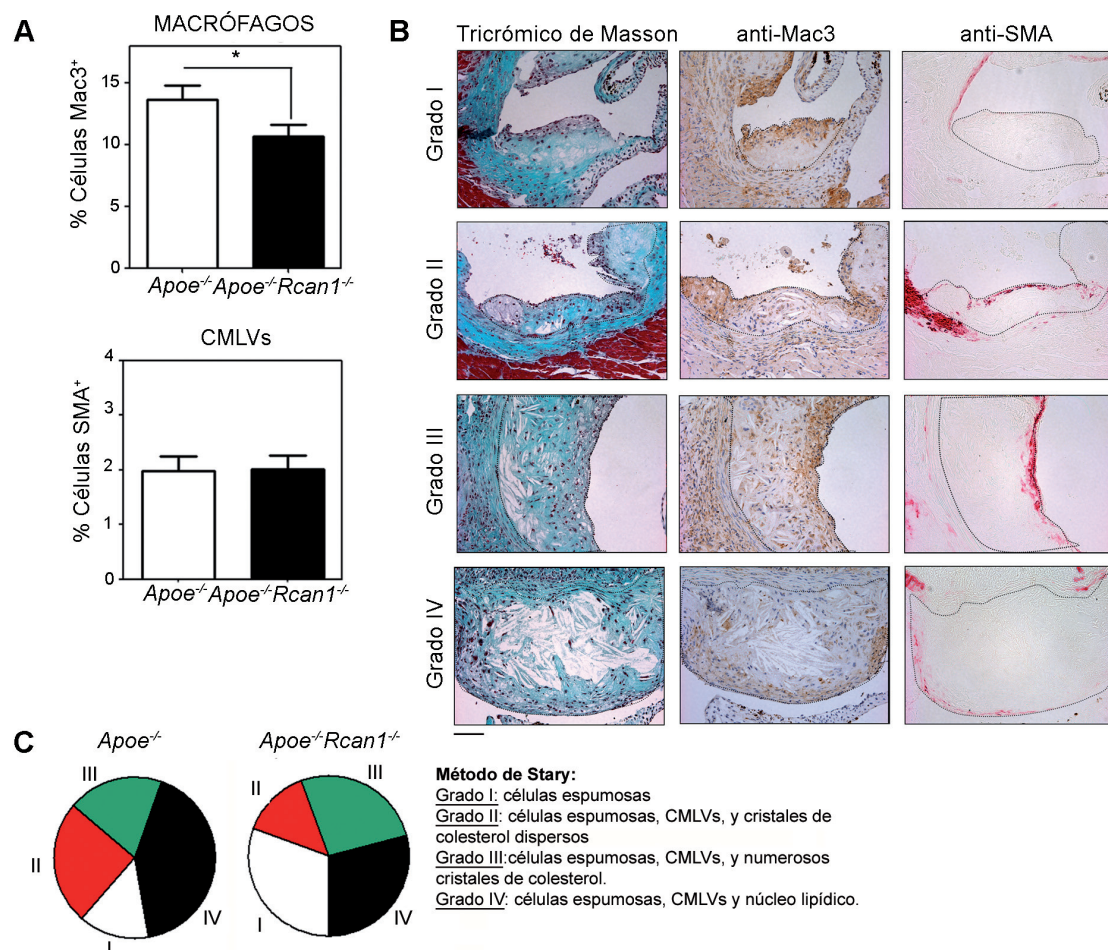


Figura 33. La ausencia de Rcan1 produce placas de aterosclerosis menos avanzadas. (A) Cuantificación de macrófagos y CMLVs en las placas de ateroma de secciones de válvulas aórticas de animales *Apoe*^{-/-} (n=11) y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (n=18) alimentados con HFD durante 6 semanas. **(B)** Imágenes representativas de Masson, Mac3 (células espumosas), y SMA (CMLVs) en lesiones de válvulas aórticas clasificadas de acuerdo con el método de Stary. **(C)** Clasificación de los ateromas en válvulas aórticas de acuerdo con el método de Stary en la misma cohorte de animales *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{+/+} mostrada en la Figura 31.

Este método, permite clasificar las lesiones en: Placas Tempranas o de Grado I, las cuales contienen solo células espumosas (Mac3⁺); lesiones de Grado II, que contienen células espumosas, CMLVs y cristales de colesterol dispersos; Grado III, con células espumosas, CMLVs y numerosos acúmulos de cristales de colesterol; y Placas Avanzadas o de Grado IV, que contienen células espumosas, CMLVs y un núcleo lipídico (espacio blanco sin señal celular dentro de la placa de ateroma) (Fig. 33B). El análisis de las lesiones después de 6 semanas de dieta mediante este método mostró que el 42% de las placas de los ratones *Apoe*^{-/-} eran de grado IV y solo el 14% de ellas se encontraban en estadios tempranos del desarrollo o grado I (Fig. 33C). Por el contrario, el porcentaje de placas de grado IV en los ratones deficientes en *Rcan1* era del 28% y el 31% de las placas eran de grado I (Fig. 33C). Estos resultados apoyaban la idea de que *Rcan1* jugaba un papel primordial en la progresión de la placa de aterosclerosis.

Dado que el grado de estabilidad de las placas es uno de los parámetros esenciales en clínica a la hora de decidir realizar o no una intervención quirúrgica, quisimos analizar además el posible papel de *Rcan1* en la estabilidad de las placas de ateroma. Aunque en el modelo de *Apoe*^{-/-} los animales alimentados con HFD no son propensos a desarrollar placas de ateroma inestables (Getz and Reardon, 2012), no podíamos descartar la posibilidad de que la ausencia de *Rcan1* influyera en su estabilidad.

Una de las características principales de las placas inestables es la presencia de una cápsula fibrosa fina, normalmente acompañada de una reducción en el contenido de colágeno. Cuanto más delgada y menos fibrosa esté esta capa que se encuentra conteniendo al centro lipídico del ateroma, más propensa es esta lesión a la ruptura y por tanto a la formación del trombo. Analizando la extensión (área ocupada por la cápsula fibrosa/área de la lesión) y también el grosor (espesor de la capa fibrosa / espesor de la lesión) de esta cápsula, descubrimos que los ratones deficientes en *Rcan1* presentaban lesiones con cápsulas fibrosas más gruesas y grandes que los controles (Fig. 34A-B). Aunque no se encontraron diferencias en el contenido de colágeno que las formaba (Fig. 34D), el patrón de deposición lipídica analizado mediante tinción de Oil Red, indicaba una menor presencia de lípidos en las válvulas de ratones deficientes en *Rcan1*^{-/-} comparado con las válvulas de los ratones control (Fig. 34C paneles de la izquierda). Utilizando una medida de estabilidad de placa, definida como la relación de los contenidos de colágeno y lípidos de la placa, observamos que esta medida era más elevada en ausencia de *Rcan1* (Fig. 34E), lo que indicaba que estos ratones presentaban placas más estables.

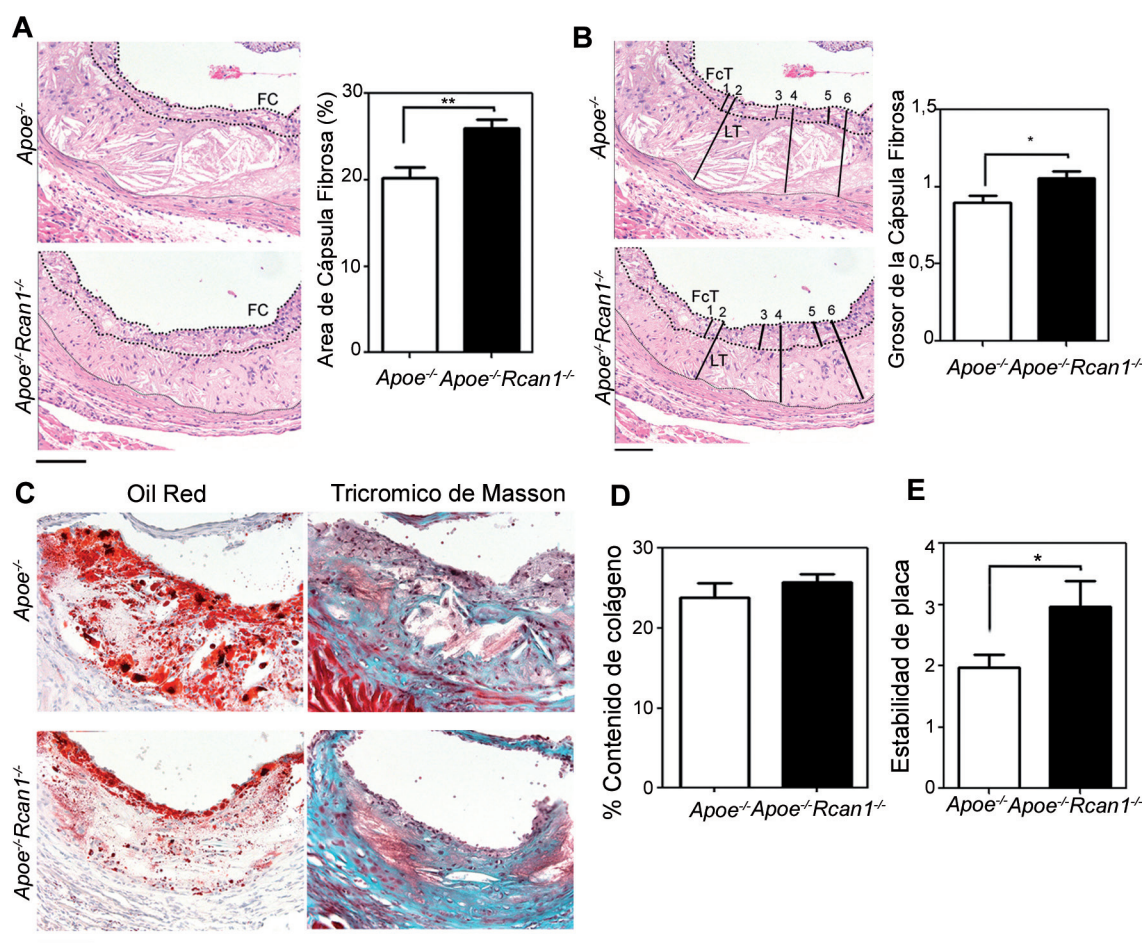


Figura 34. La deficiencia en Rcan1 no disminuye la estabilidad de la placa. (A) Tinciones representativas con HE y cuantificación del área de la cápsula fibrosa de las lesiones en las válvulas aórticas de animales *Apoe*^{-/-} (n=25 válvulas) y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (n=45 válvulas) alimentados con HFD durante 6 semanas. Los datos se muestran en porcentaje relativizados al área de lesión (media±SEM). **p<0,01. Las líneas punteadas finas y gruesas denotan respectivamente los límites de la lesión y de la capsula fibrosa (FC). **(B)** Imágenes de tinción con HE de lesiones en válvulas aórticas de la misma cohorte de animales que en A. Los datos son el resultado de medir el grosor de la capsula fibrosa (FcT) y el de la lesión (LT) en tres puntos del centro de la placa. Escala, 50 µm. Cuantificación normalizada del grosor de la cápsula fibrosa relativa al de la lesión (media±SEM). *p<0,05. **(C)** Imágenes representativas de tinción con Oil Red y Tricómico de Mason de criosecciones de lesiones en válvulas aórticas de la misma cohorte de animales. Escala, 50 µm. **(D)** Cuantificación de contenido de colágeno en la cápsula fibrosa de estas lesiones (media±SEM). **(E)** Análisis del grado de estabilidad de las placas determinado como el cociente entre los contenidos de colágeno y de lípidos en las mismas lesiones (media±SEM). *p<0,05.

La expresión de metaloproteinasas *MMP2* y *MMP9*, otro indicativo de inestabilidad de placa debido a su implicación en degradación de matriz extracelular, era idéntica entre ratones deficientes o no en *Rcan1* (Fig. 35A). Tampoco detectamos en estas lesiones evidencias de hemorragias en el interior de las placas (Fig. 35B-D), también marcadores potenciales de inestabilidad. En conjunto, nuestros datos indicaban que en ausencia de *Rcan1* las placas de aterosclerosis eran más pequeñas y mostraban características de menor progresión y mayor estabilidad.

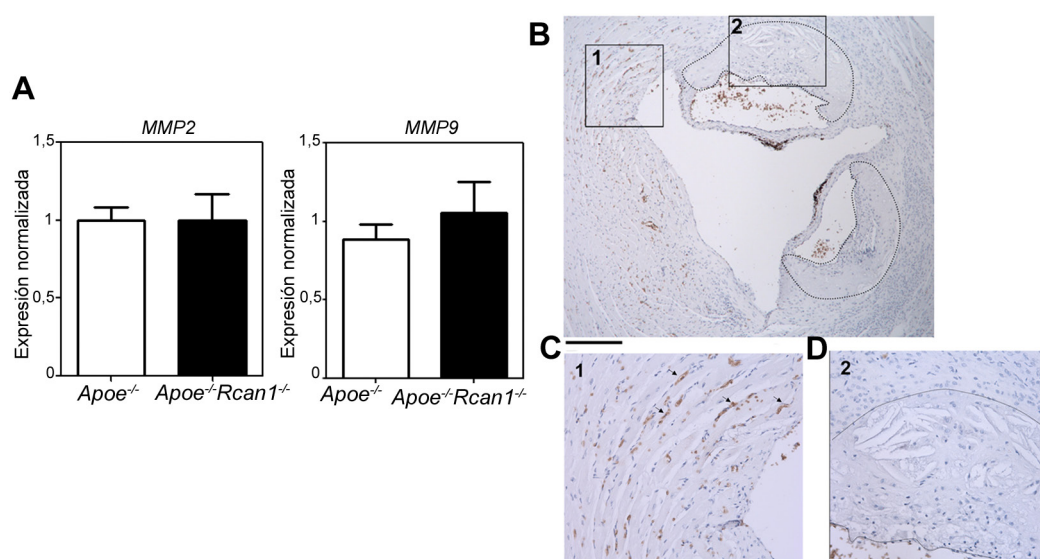


Figura 35: La deficiencia en *Rcan1* no modifica la expresión de *MMP2* y *MMP9* y no induce hemorragias intraplaca. (A) Análisis mediante qPCR de la expresión de *MMP2* y *MMP9* en cayados aórticos de animales *Apoe*^{-/-} (n=12) y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (n=14) alimentados con HFD durante 6 semanas. Los resultados proceden del pool de 3 experimentos independientes. Las cantidades de ARNm fueron normalizadas con la expresión del control endógeno *m36B4* (media±SEM). **(B-D)** IHQ representativas de tinción de Ter119 (eritrocitos) en válvulas ateroscleróticas de animales *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-}. Escala, 200 µm. Las líneas señalan los límites de la lesión. **(C)** Amplificación de la región señalada como 1 en B correspondiente a una región de tejido cardíaco fuera de la lesión. Las flechas señalan las células Ter119⁺. **(D)** Amplificación de la región señalada como 2 en B, correspondiente a una región intraplaca. Escala, 50 µm. Las imágenes son representativas de 12 cortes de válvulas aórticas pertenecientes a 4 ratones *Apoe*^{-/-} y otros 12 cortes de válvulas pertenecientes a 4 ratones *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-}.

3.3. Funciones de *Rcan1* en macrófagos

3.3.1. *Rcan1* regula la expresión de *CD36* y media la formación de células espumosas

Los macrófagos son el tipo celular más abundante en las placas de ateroma (Hansson and Hermansson, 2011). Poseen un papel importante en las primeras etapas del desarrollo del ateroma debido a su capacidad de captación de LDLox del medio, que les hace transformarse en células espumosas. Dado que *Rcan1* parecía tener un papel importante en el desarrollo de la placa y que su expresión se inducía en macrófagos con LDLox, nuestro siguiente propósito fue estudiar el posible papel de *Rcan1* en la formación de células espumosas. Para ello empleamos macrófagos peritoneales procedentes de animales *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} y los expusimos a LDLox o LDL nativas (no modificadas). La tinción de Oil Red O de estas células reveló que mientras que los macrófagos procedentes de animales *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} captaban de forma similar las LDL nativas (Fig. 36A), el porcentaje de macrófagos convertidos a células espumosas por captación de LDLox era menor en ausencia de *Rcan1* (Fig. 36B).

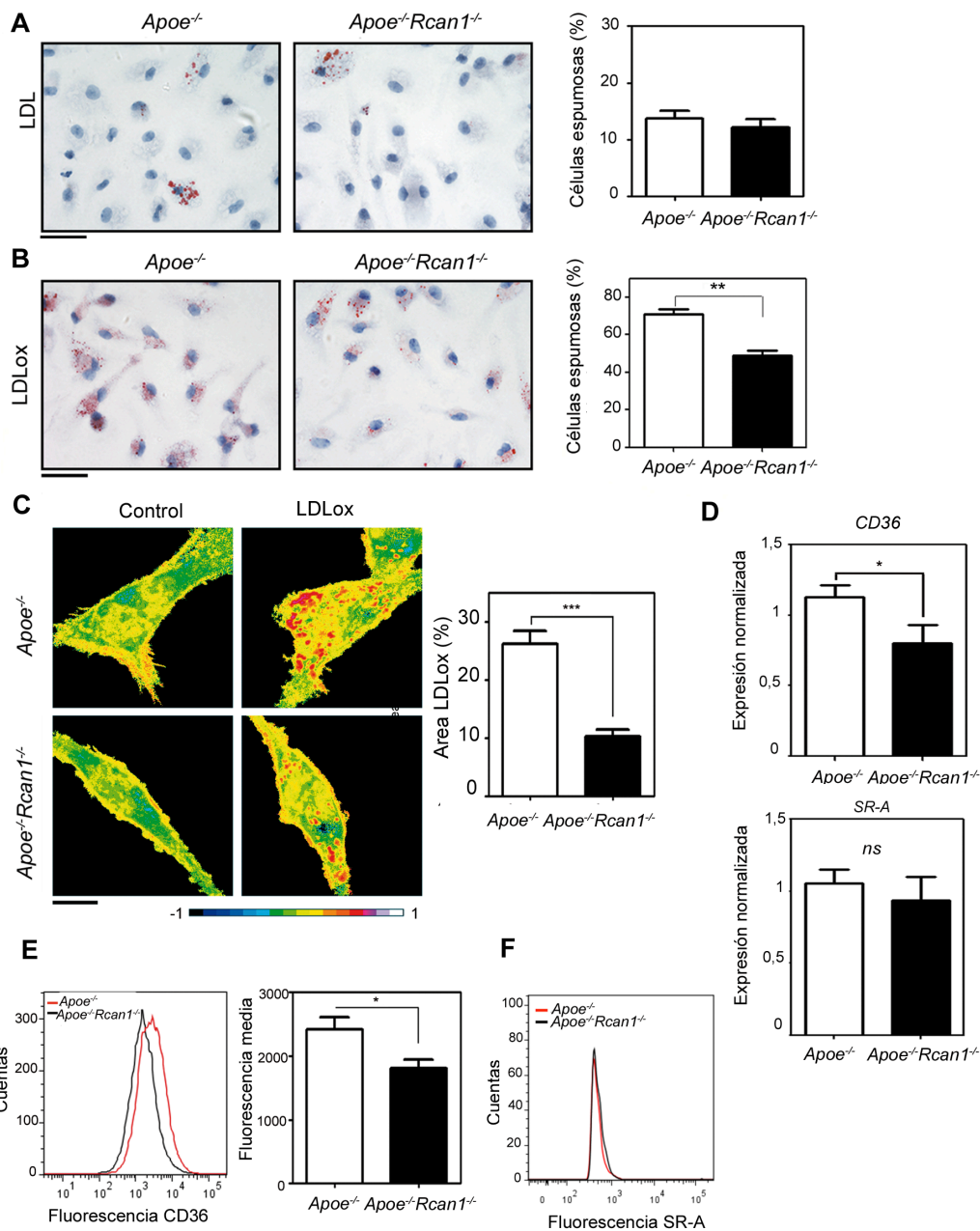


Figura 36. Rcan1 media la captación de LDLox por parte de los macrófagos y la formación de células espumosas. (A-B) Macrófagos peritoneales *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} fueron expuestos a (A) LDL nativas o a (B) LDLox durante 24 h y posteriormente teñidas con Oil Red. Se muestran imágenes representativas de la tinción con Oil Red en células y la cuantificación del porcentaje de células teñidas en tres experimentos independientes (media ± SEM). **p<0,01. Escala, 20 µm. (C) Macrófagos peritoneales *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} cultivados en medio solo (control) o con LDLox fueron teñidos con Laurdan. Se muestran imágenes representativas y cuantificación del área ocupada por LDLox (puntos rojos) (n=20, media ± SEM). ***p<0,0001. Escala, 10 µm. (D) Análisis mediante qPCR de la expresión de CD36 y SR-A en cayado aórtico aterosclerótico de ratones *Apoe*^{-/-} (n=12) y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (n=13). Los resultados proceden del pool de 3 experimentos independientes (media ± SEM). Las cantidades de ARNm fueron normalizadas con la expresión de control endógeno *m36B4*. *p<0,05. ns, no significativo. (E) Histogramas de citometría de flujo mostrando la fluorescencia de los macrófagos de los diferentes genotipos teñidos con CD36. La cuantificación muestra la mediana de los niveles de fluorescencia de 3 experimentos independientes (media ± SEM). *p<0,05 (F) Histogramas de citometría de flujo mostrando la fluorescencia de los macrófagos de los diferentes genotipos teñidos con SR-A.

Además de que los macrófagos *Rcan1*^{-/-} tenían menos capacidad de captar LDLox y transformarse en células espumosas, parecía que los que llegaban a ello, presentaban menos partículas citoplasmáticas de LDLox por célula que los *Rcan1*^{+/+} (Fig. 36B).

Para analizar de forma más precisa el contenido de LDLox en el interior celular, utilizamos la técnica conocida como polarización generada con Laurdan (Laurdan GP) (Sanchez et al., 2007; Sanchez et al., 2010). Esta técnica de microscopía confocal proporciona información relativa de la cantidad de agua presente en los compartimentos lipídicos de la célula. Normalmente, las partículas de LDLox intracelulares se encuentran fuertemente empaquetadas y producen un desplazamiento del Laurdan GP a través de las frecuencias rojas (Ferretti et al., 2002). Sin embargo, otros compartimentos lipídicos celulares, entre los que se incluye las membranas intracelulares, están menos empaquetados y por tanto contienen más agua, dando una señal de Laurdan entre el verde y el amarillo (Sanchez et al., 2007; Sanchez et al., 2010). Como se muestra en la figura 36C, la presencia de LDLox en el citosol de los macrófagos se observa como pequeños puntos de color rojo. La cuantificación del área ocupada por las LDLox reveló que, como sugería la tinción de Oil Red, los macrófagos *Apoe*^{-/-} captaban alrededor de 2,5 veces más LDLox por célula que los macrófagos *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (Fig. 36C).

Los procesos de captación de LDLox y la sucesiva formación de células espumosas se producen en macrófagos a través de receptores específicos denominados Receptores Scavenger de clase A y B: SR-A y CD36 (Febbraio et al., 2000; Suzuki et al., 1997). Ya que *Rcan1* parecía estar implicado en los procesos de captación de LDLox, analizamos la expresión de estos receptores tanto en macrófagos *ex vivo*, como en ARN de cayado aórtico de animales *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-}. El análisis mediante qPCR del ARNm de cayados de animales *Apoe*^{-/-} mostraba mayores niveles de *CD36* que el de cayados de animales *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (Fig. 36D). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la expresión de *SR-A* entre genotipos (Fig. 36D). De acuerdo con estos resultados, el análisis *ex vivo* de expresión proteica de estos receptores en macrófagos mediante citometría de flujo, reveló que los niveles de CD36, pero no los de SR-A, eran menores en los macrófagos *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (Fig. 36E-F). Para completar estos estudios y aportar mayor información a la implicación de *Rcan1* en estos procesos, se llevaron a cabo experimentos de reconstitución de la expresión de *Rcan1* en células deficientes. La reexpresión de esta proteína por infección con lentivirus que expresaban *Rcan1*-1 y *Rcan1*-4 en macrófagos *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (Fig. 37A), incrementó los niveles de expresión de CD36 (Fig. 37B) y el número de partículas de LDLox captadas por estas células (Fig. 37C-D).

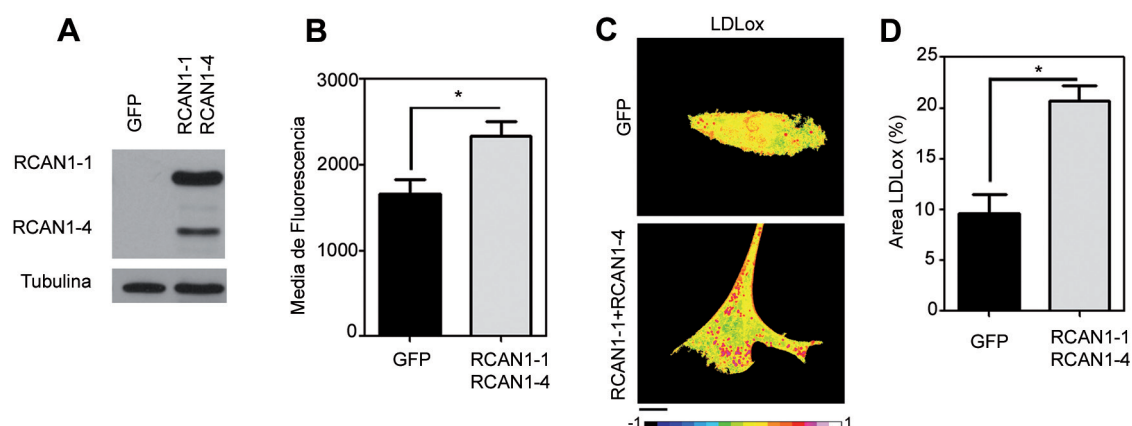
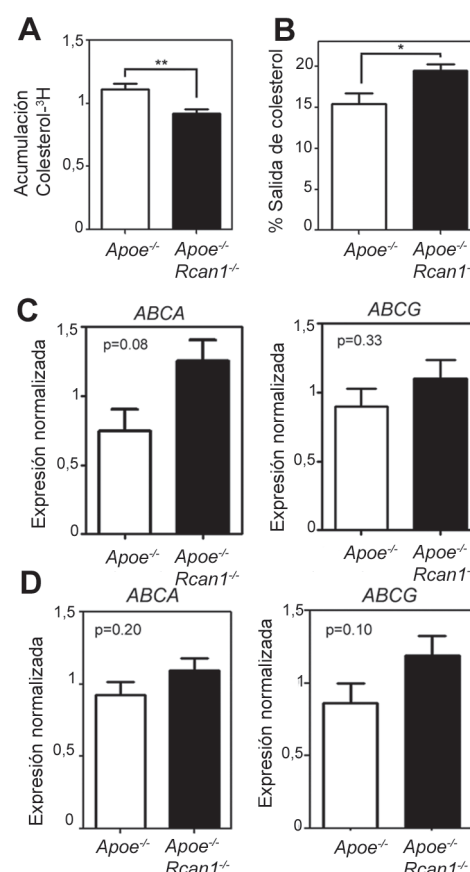


Figura 37. La reexpresión de Rcan1 en macrófagos *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} incrementa la expresión de CD36 y su capacidad de captación de LDLox. Los macrófagos peritoneales *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} fueron infectados con lentivirus que codifican para GFP o para Rcan1-1-IRES-GFP (RCAN1-1) y Rcan1-4-IRES-GFP (RCAN1-4). **(A)** Inmunoblot representativo de la expresión de Rcan1 en estas células. **(B)** Cuantificación normalizada de la mediana de los niveles de fluorescencia de CD36 determinada por citometría de flujo en la población de células GFP positivas (n=4, media ± SEM). *p<0,05. **(C)** Imágenes representativas de Laurdan GP. Escala, 10µm. **(D)** Cuantificación del área cubierta por LDLox (puntos rojos) en células GFP positivas después de su cultivo en presencia de LDLox (n=3, media ± SEM). *p<0,05).

Las alteraciones en la acumulación lipídica que observamos en macrófagos deficientes en Rcan1 podían deberse no solo a problemas en la entrada de partículas de LDLox, sino también a alteraciones en el reciclado o salida de colesterol de la célula. Para investigar si Rcan1 también contribuía a los procesos de salida de colesterol, indujimos la formación de células espumosas en macrófagos *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} mediante la administración de LDL acetiladas (LDLac) en presencia de colesterol tritiado (³H-colesterol) y observamos nuevamente que las células deficientes en Rcan1 incorporaban menos colesterol (Fig. 38A). Posteriormente, para promover la salida de colesterol de las células, añadimos lipoproteínas de alto peso molecular (HDL) a los cultivos y observamos que los macrófagos deficientes en Rcan1 presentaban una capacidad ligeramente más elevada para expulsar el colesterol hacia el medio (Fig. 38B). Consistente con estos datos, la expresión de los transportadores *ABCA-1* y *ABCG-1* encargados de la salida de colesterol, podría ser levemente más alta en los macrófagos (Fig. 38C) y en cayados de animales deficientes en Rcan1 (Fig. 38D).

Todos estos datos apoyaban que Rcan1 desempeñaba un papel central en los procesos de formación de células espumosas por medio de la regulación del receptor CD36 y quizás también, aunque solo moderadamente, por regulación del reciclado de colesterol.

Figura 38. Rcan1 es un regulador moderado de los procesos de salida de colesterol de los macrófagos. (A) Gráfica de la acumulación de Colesterol ^3H en macrófagos peritoneales en presencia de LDLac y (B) análisis de la salida de colesterol ^3H en macrófagos peritoneales cargados con LDLac y posteriormente tratados con HDL (100 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 h. Los datos muestran la media \pm SEM (n=4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (C-D) Análisis mediante PCR cuantitativa de la expresión de los transportadores ABCA y ABCG en (C) macrófagos peritoneales (n=4) y en (D) cayados aórticos de animales *Apoe* $^{-/-}$ (n=12) y *Apoe* $^{-/-}$ *Rcan1* $^{-/-}$ (n=13) alimentados con HFD durante 6 semanas. Los datos proceden de un pool de 3 experimentos independientes. Las cantidades de ARNm fueron normalizadas con la expresión del control endógeno *m36B4* (media \pm SEM).



3.3.2. Rcan1 regula la migración de macrófagos inhibida por LDLox

La presencia de macrófagos en las placas de ateroma depende no solo de su reclutamiento, sino también de su capacidad para reciclarse y salir de la placa. A diferencia de otras patologías inflamatorias en las que existe este reciclaje, en la patología aterosclerótica las partículas de LDLox captadas por los macrófagos hacen que estos sean menos permisibles al movimiento, por lo que quedarían retenidos en la lesión, favoreciendo su progresión (Angeli et al., 2004; Randolph, 2008). Dado que hemos descrito que Rcan1 es imprescindible para la migración de CMLVs inducida por AngII (Fig. 24) y que otros trabajos también han descrito su papel en la migración de otros tipos celulares (Espinosa et al., 2009; Iizuka et al., 2004; Minami et al., 2004), nos planteamos que Rcan1 podría estar involucrado en la migración de los macrófagos. En primer lugar, determinamos si Rcan1 era necesario en la migración de macrófagos frente a un estímulo quimiotáctico. Observamos que macrófagos *Apoe* $^{-/-}$ y *Apoe* $^{-/-}$ *Rcan1* $^{-/-}$ migraban de manera similar en respuesta a la proteína quimio-atrayente de monocitos (MCP-1) o a la combinación de MCP-1 y FBS (Fig. 39A). Partiendo de que ambos genotipos de macrófagos presentaban un mismo comportamiento migratorio ante este estímulo, investigamos si Rcan1 podría participar en la migración de macrófagos cargados con LDLox. Para ello, macrófagos *Apoe* $^{-/-}$ y *Apoe* $^{-/-}$ *Rcan1* $^{-/-}$ fueron cargados con LDLox y expuestos a un estímulo quimio-

atrayente. Observamos que, mientras que los macrófagos *Apoe*^{-/-} cargados con LDLox tenían claramente inhibida su migración hacia el estímulo, la migración de los macrófagos *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} apenas se veía afectada por la presencia de LDLox (Fig. 39B-C).

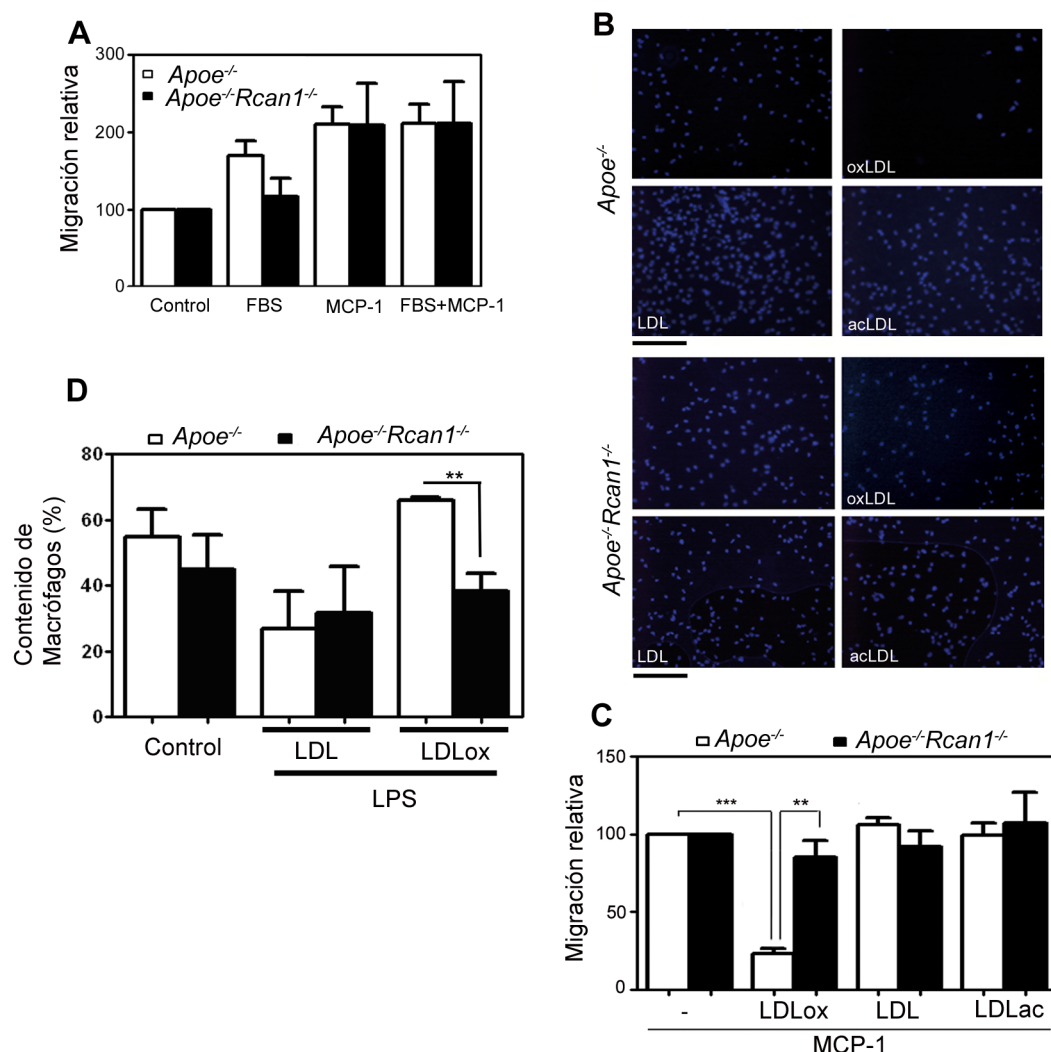


Figura 39. La inhibición de la migración de macrófagos por LDLox depende de la expresión de Rcan1. **(A)** Macrófagos peritoneales *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} fueron sembrados en la parte superior de una membrana porosa de transwell. En la cámara inferior se añadió medio solo (control) o medio suplementado con FBS, MCP-1 o FBS + MCP-1. Después de 18 h, las células no migradas fueron limpiadas y la membrana fue teñida con Hoechst. La gráfica representa la cuantificación de células migradas en 10 campos por condición. Los datos se relativizaron al control de células no tratadas (media±SEM; n=4). **(B)** Imágenes representativas de tinción nuclear con Hoescht de las membranas de transwell. Escala, 100 μm **(C)** Cuantificación de los macrófagos migrados en 10 campos por condición. Los datos están relativizados al control de células no tratadas (media±SEM; n=4). ***p<0.001, **p<0,01. **(D)** Ratones *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} fueron inoculados intraperitonealmente con tioglicolato y 4h después con una inyección intraperitoneal de LPS. En algunos casos, los animales fueron pre-tratados con 50 μg de LDL o LDLox 1 h antes de la inyección del LPS. Los macrófagos peritoneales fueron extraídos mediante lavados intraperitoneales y contados por citometría de flujo. Los datos son la media de células CD11b⁺ presentes en los lavados (n=3; media ± SEM; **p<0,01).

Aunque los ensayos *in vivo* de migración de células espumosas desde la placa de aterosclerosis hacia otras partes del ratón no están muy optimizados, existen aproximaciones alternativas para analizar la capacidad inhibidora de migración de las LDLox. Uno de estos procedimientos está basado en el reclutamiento de macrófagos a la cavidad peritoneal mediante la inoculación de tioglicolato, su tratamiento *in situ* con LDLox (por inyección intraperitoneal) y la inducción posterior de su salida de la cavidad peritoneal mediante la inoculación de LPS. Usando este modelo encontramos que la deficiencia en Rcan1 facilitaba la salida de los macrófagos tratados con LDLox (células espumosas) en cierta medida (Fig 33D). De acuerdo con estos estudios, también realizamos ensayos de cierre de herida con macrófagos en cultivo y observamos que las LDLox inhibían la migración aleatoria de los macrófagos *Apoe*^{-/-} tratados con MCP-1, pero no la de macrófagos *Apoe*^{-/-} *Rcan1*^{-/-}, como reveló el acúmulo de células que ocupaba la zona denudada (Fig. 40A-B).

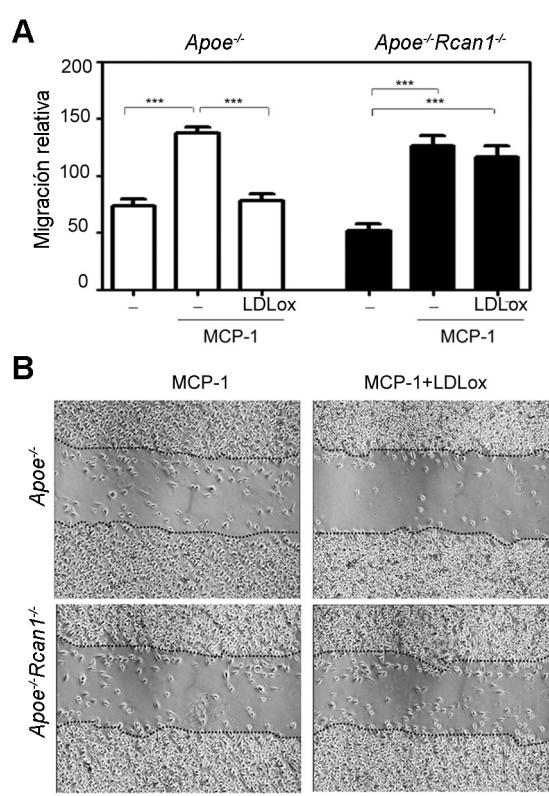


Figura 40. La inhibición de la motilidad de los macrófagos por las partículas de LDLox depende de la expresión de Rcan1. Se realizaron experimentos de cierre de herida en monocapas de macrófagos *Apoe*^{-/-} o *Apoe*^{-/-} *Rcan1*^{-/-} incubando las células después del daño con medio solo (control) o con medio suplementado con MCP-1 (100 ng/ml) + 10%FBS y en presencia o ausencia de LDLox (50 µg/ml). La migración de estos macrófagos hacia la zona denudada se monitorizó mediante foto-microscopia. **(A)** Cuantificación de los macrófagos migrados en 10 campos por condición mostrada como, número de células relativo al área de la herida (media ± SEM). **p<0,01, ***p<0,001. **(B)** Imágenes representativas de la región de la herida en una capa confluyente de macrófagos. Escala, 100 µm.

Resultados

Todos estos resultados sugerirían que Rcan1 no se encontraba directamente implicado en la migración de los macrófagos, si no que parecía mediar la inhibición de la salida de estas células de las placas de ateroma promovida por las LDLox.

3.3.3. Papel de Rcan1 en la expansión de los macrófagos

La migración celular es un proceso complejo que implica ciclos de adhesión y separación de la célula del sustrato. En ellos la célula se expande formando zonas de contactos focales por los que se adhiere al sustrato, y ciclos de ruptura de estos contactos para separarse (Stossel, 1994). Con objeto de profundizar en los mecanismos por los que Rcan1 inhibe la migración quimiotáctica de macrófagos causada por LDLox, analizamos la expansión de macrófagos *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} tras su estimulación con LDLox. La cuantificación automatizada de la expansión de los macrófagos reveló que mientras que los macrófagos *Apoe*^{-/-} mostraban formas estrelladas al cabo de 30 minutos de su exposición a LDLox, los macrófagos deficientes en Rcan1 mantenían formas redondeadas (Fig. 41), sugiriendo un papel mediador de Rcan1 en la expansión de estos macrófagos inducida por LDLox.

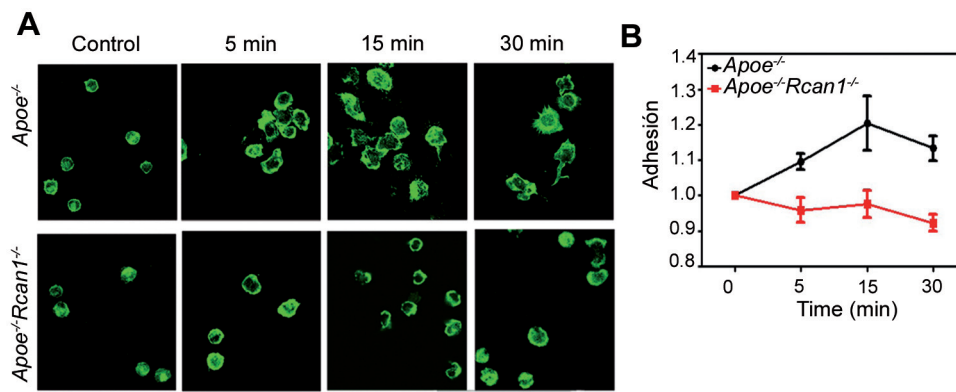


Figura 41. Rcan1 regula la expansión de macrófagos inducida por LDLox. Los macrófagos *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} fueron sembrados en cristales previamente tratados con suero e incubados con LDLox (50 µg/ml) a 37°C, fijados, teñidos y fotografiados después de los tiempos indicados. **(A)** Imágenes representativas de fotomicroscopía (Escala, 20 µm) y **(B)** cuantificación del grado de expansión de las células medido de forma automatizada (media ± SEM). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

3.3.4. Papel de Rcan1 en la polarización de macrófagos

La presencia de diferentes poblaciones de macrófagos a lo largo del desarrollo de la placa de ateroma es un tema actual de análisis y discusión por muchos grupos de investigación. En lesiones humanas de ateroma (Waldo et al., 2008), así como en lesiones en ratones deficientes en receptor LDL (Kadl et al., 2010), se han descrito subpoblaciones de macrófagos pro-inflamatorios tipo M1 y anti-inflamatorios tipo M2. Aunque ambos tipos de macrófagos han sido detectados en las lesiones ateroscleróticas, los macrófagos de tipo pro-inflamatorios o M1 parecen ser los más abundantes (Waldo et al., 2008). Dado que las

partículas de LDLox inducen la expresión de marcadores pro-inflamatorios (Chase et al., 2002) y que los macrófagos *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} ingieren de forma menos eficiente partículas de LDLox que los macrófagos *Apoe*^{-/-}, nos planteamos la posibilidad de que las lesiones ateroscleróticas de los ratones *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} contuvieran macrófagos con un fenotipo distinto al de los macrófagos de los ratones *Apoe*^{-/-}. Para comprobar nuestra hipótesis, analizamos la expresión de marcadores fenotípicos de macrófagos tipo M2, como el receptor de manosa (*Mrc1*) o la *IL-10*, en ateromas de válvulas aórticas de ratones *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-}. Observamos que la expresión de ambas proteínas estaba aumentada en lesiones de animales deficientes en *Rcan1* (Fig. 42A-B) y que la expresión de ARNm de *IL-10* también se encontraba aumentada en cayados de animales *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (Fig. 42C).

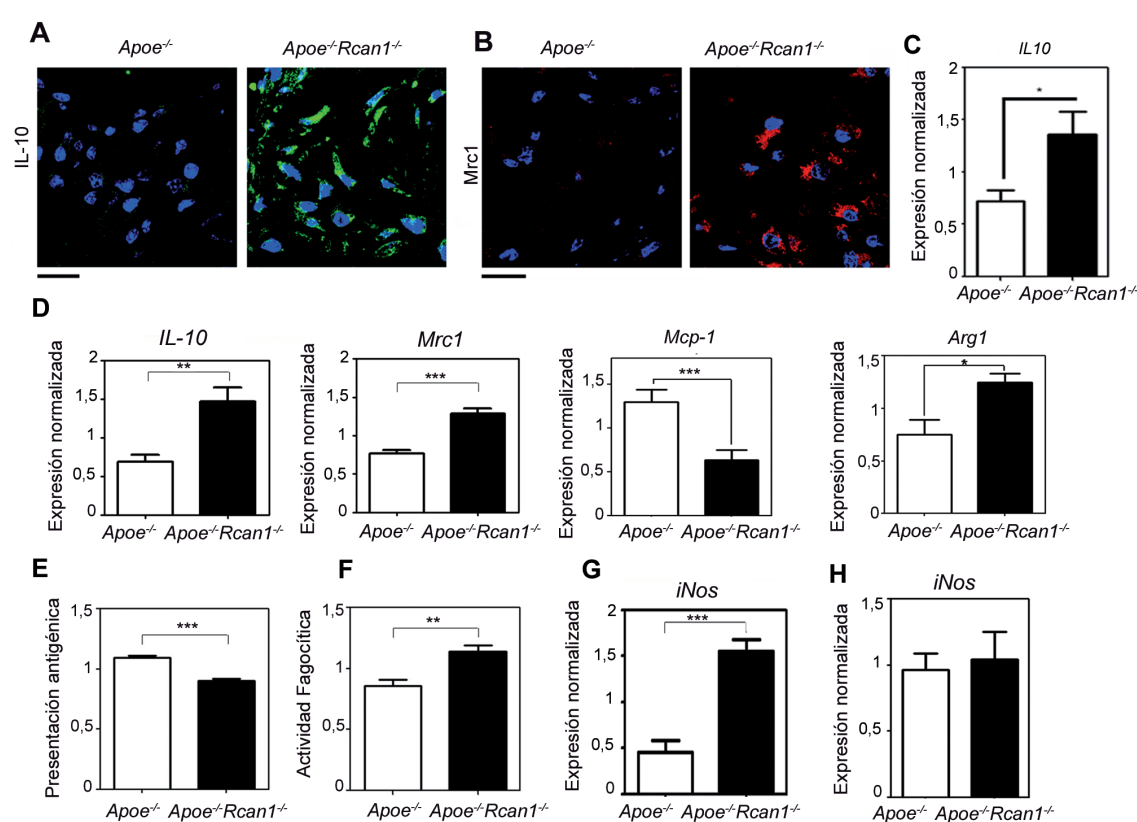


Figura 42. La ausencia de *Rcan1* aumenta la expresión de marcadores anti-inflamatorios en ateromas y en macrófagos peritoneales. (A-B) Inmunofluorescencias representativas de tinción de **(A)** *IL-10* y **(B)** *Mrc1* en ateromas de válvulas aórticas de ratones *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} alimentados con HFD durante 6 semanas. Escala, 20 μm. **(C)** Análisis mediante qPCR de la expresión de *IL-10* en cayado aórtico de animales *Apoe*^{-/-} (n=12) y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (n=13). Los resultados mostrados proceden de un pool de 3 experimentos independientes. **(D)** Análisis mediante qPCR de la expresión de *IL-10*, *Mrc1*, *Mcp-1*, y *Arg1* en macrófagos peritoneales de ratones *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-}. **(E)** Presentación antigénica (ovalbúmina) de los macrófagos *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} a las células de hibridoma B3ZT. Los datos son medias±SEM (n=4). **(F)** Número relativo de glóbulos rojos de sangre fagocitados por los macrófagos *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (medias±SEM; n=4). **(G)** Análisis mediante qPCR de la expresión de *iNos* en macrófagos peritoneales y en **(H)** cayado aórtico de animales *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-}. **(C, D y H)** Las cantidades de ARNm fueron normalizadas con la expresión del control endógeno *m36B4* (media±SEM n=3). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Estos resultados nos llevaron a investigar si Rcan1 podría tener un papel regulador en la polarización de macrófagos. Para ello utilizamos macrófagos peritoneales extraídos de animales *Apoe*^{-/-} y *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-}. Tanto la expresión de *Mrc1* como la de *IL-10* y la de otro marcador de macrófagos anti-inflamatorios, como es Arginasa1 (*Arg1*), estaban significativamente aumentadas en macrófagos *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (Fig. 42D). Además, los macrófagos deficientes en Rcan1 expresaban niveles más bajos de una de las citoquinas pro-inflamatorias más importantes en esta patología, Mcp-1 (Fig. 42D). Igualmente, mostraban menor capacidad de presentación antigénica (Fig. 42E) y mayor actividad fagocítica (Fig. 42F), ambas características de macrófagos con fenotipo anti-inflamatorio. Sin embargo, los niveles de expresión de *iNos*, un marcador pro-inflamatorio, también eran elevados en los macrófagos *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} extraídos del peritoneo (Fig. 42G), pero no en las lesiones ateroscleróticas (Fig. 42H).

El conjunto de estos resultados apoyaba que la deficiencia en Rcan1 podría incrementar la expresión de marcadores anti-inflamatorios.

4. La expresión de Rcan1 en células hematopoyéticas es esencial para la progresión de la aterosclerosis, pero no para la formación de AAA

Aunque en la mayoría de patologías vasculares se asume que el componente vascular es el principal encargado del remodelado, el compartimento hematopoyético también tiene un papel fundamental y, de hecho, algunas de estas patologías se consideran como enfermedades inflamatorias crónicas. En el caso de la aterosclerosis, todos nuestros resultados nos sugerían que el papel de Rcan1 en macrófagos podría ser imprescindible para promover el desarrollo de esta enfermedad. Asimismo, en AAA observamos que Rcan1 se expresaba no solo en el compartimento vascular, si no también en células inmunes, como macrófagos y linfocitos T. Para esclarecer el posible papel de Rcan1 en el compartimento hematopoyético en estas patologías nos propusimos realizar modelos de trasplante de médula ósea.

Para ello, irradiamos letalmente ratones *Apoe*^{-/-} y les trasplantamos médula ósea procedente de fémures y tibias de animales *Apoe*^{-/-} (*Rcan1*^{+/+}) o *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (*Rcan1*^{-/-}). Transcurridos 2 meses del trasplante, analizamos la eficiencia de la reconstitución de la médula ósea por medio del análisis de poblaciones celulares en sangre periférica. Observamos que la falta de Rcan1 no causaba diferencias en los porcentajes de las poblaciones sanguíneas (Fig. 43A-C). Además, el análisis mediante qPCR de la expresión de *SRY* (gen ubicado en el cromosoma Y) (Fig. 43D) y mediante PCR de la expresión de Rcan1 (Fig. 43E) en ADN de sangre periférica, mostró una eficiencia de reconstitución cercana al 80%.

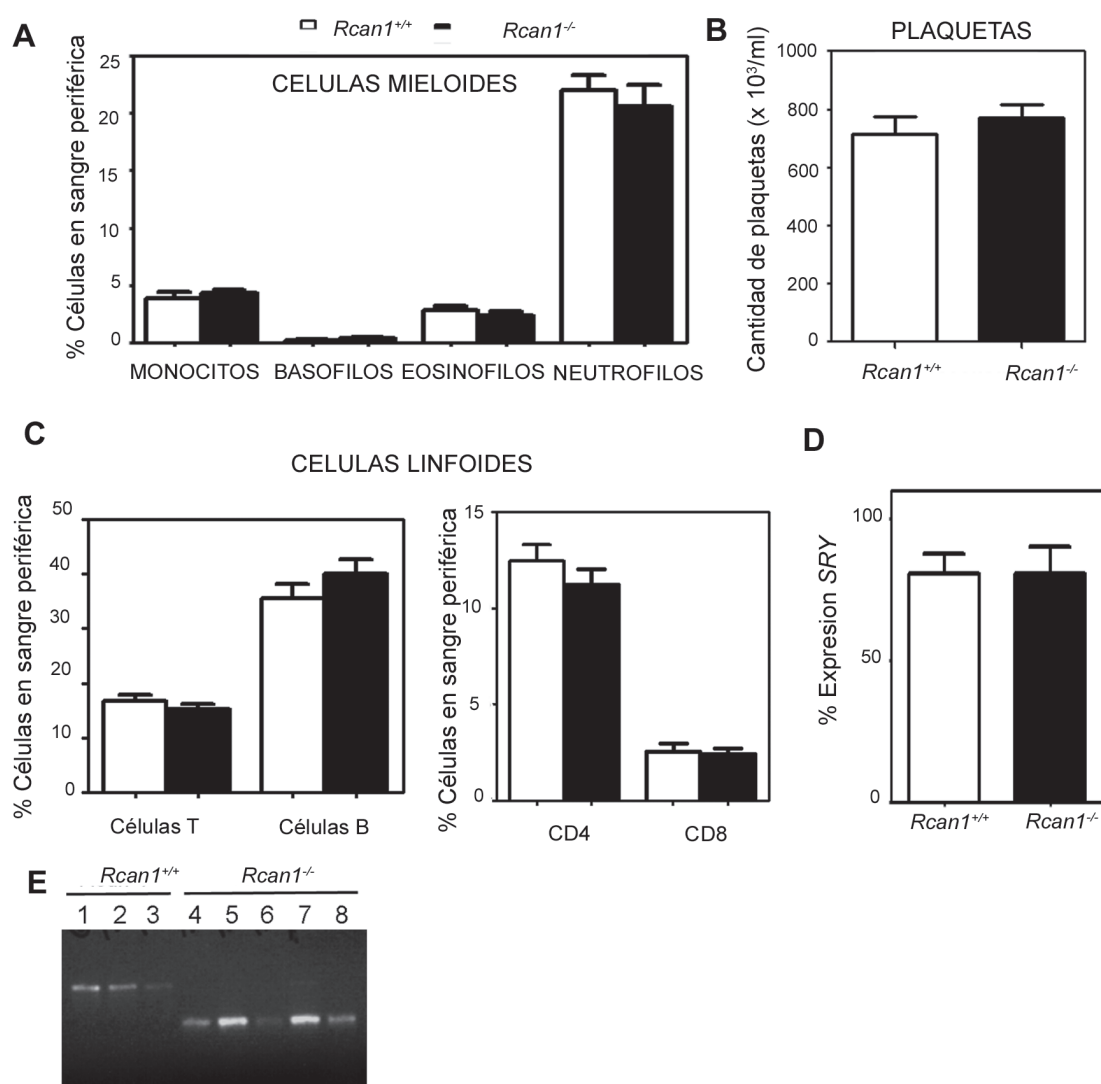


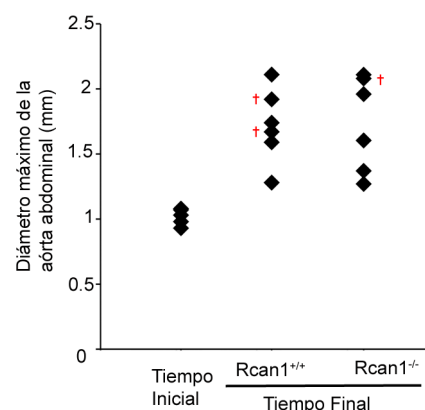
Figura 43. La ausencia de Rcan1 no altera la naturaleza de las poblaciones celulares sanguíneas tras el trasplante de médula ósea. (A-C) Análisis de las poblaciones de leucocitos circulantes 4 semanas después del trasplante de células de médula ósea de ratones *Apoe*^{-/-} (*Rcan1*^{+/+}; n=8) o *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (*Rcan1*^{-/-}; n=8). Los datos proceden de un pool de dos experimentos independientes (media±SEM). **(D)** Análisis mediante qPCR de la expresión de *SRY* en células de sangre circulante de ratones hembra *Apoe*^{-/-} trasplantadas con médula ósea de machos *Apoe*^{-/-} (*Rcan1*^{+/+}) o *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (*Rcan1*^{-/-}). **(E)** Análisis de *Rcan1* mediante PCR en ADN de muestras de sangre de animales trasplantados con células de *Apoe*^{-/-} (*Rcan1*^{+/+}; carriles 1-3) y con células *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (*Rcan1*^{-/-}; carriles 4-8). Cada carril muestra un animal.

4.1. La expresión de Rcan1 en células hematopoyéticas no es necesaria para el desarrollo de AAA

Ya que *Rcan1* estaba expresado en la adventicia de tejido de AAA, y ya que en esta zona también observamos células hematopoyéticas, investigamos si la expresión de *Rcan1* en estas células era crítica para la inducción de AAA por AngII. Para ello, animales *Apoe*^{-/-} fueron irradiados letalmente, trasplantados con médula ósea de ratones

Apoe^{-/-} (*Rcan1*^{+/+}) o *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (*Rcan1*^{-/-}) y posteriormente tratados con AngII durante 28 días. Encontramos que no existían diferencias en la formación del AAA entre estos grupos, observándose en todos ellos desarrollo de lesiones (Fig. 44). Estos resultados sugerían que la expresión de *Rcan1* en el compartimento hematopoyético no es esencial para la inducción de aneurismas por AngII.

Figura 44. La expresión de *Rcan1* en células hematopoyéticas no es esencial para la formación de AAA inducida por AngII. Diámetros abdominales aórticos máximos medidos en imágenes tomadas de forma transversal en la zona suprarrenal de aortas de animales al principio y al final de su tratamiento con AngII. Los rombos representan animales individuales y medias±SEM, respectivamente, de animales *Apoe*^{-/-} trasplantados con células de médula ósea de *Apoe*^{-/-} (*Rcan1*^{+/+}; n=6) o *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (*Rcan1*^{-/-}; n=6). Las cruces rojas indican animales muertos antes del final del experimento.



4.2. La expresión de *Rcan1* en células hematopoyéticas desempeña un papel central en el desarrollo de la aterosclerosis

En el caso de la enfermedad de aterosclerosis, todos los resultados mostrados parecían indicar que *Rcan1* en células hematopoyéticas, y especialmente en macrófagos, podría desempeñar un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis. Por ello, mediante trasplante de médula ósea, determinamos si la deficiencia de *Rcan1* en células hematopoyéticas afectaba al desarrollo de esta enfermedad. Descubrimos que, tras 4 semanas de reconstitución medular seguidas de 6 semanas de alimentación con HFD, los animales *Rcan1*^{-/-} y *Rcan1*^{+/+} mostraban perfiles similares de ganancia de peso y de concentraciones de TGA, CL, CT, HDL, o LDL en suero (Fig. 45A-C). El análisis de la tinción con Oil Red de aorta completa reveló que los ratones irradiados y trasplantados con médula ósea de ratones *Apoe*^{-/-} desarrollaban considerablemente menos aterosclerosis que los ratones *Apoe*^{-/-} no irradiados (Fig 45D vs 31A), de acuerdo con datos previamente publicados (Nigro et al., 2010). Este mismo análisis de aorta completa también reveló que los ratones trasplantados con médula ósea deficiente en *Rcan1* mostraban una marcada disminución del área de lesión respecto a los trasplantados con médula ósea *Rcan1*^{+/+} (Fig. 45D). Del mismo modo, el análisis de secciones de tejido de aorta ascendente y válvula aórtica teñidas con HE mostraba lesiones significativamente más pequeñas en los ratones trasplantados con *Rcan1*^{-/-}.

En conjunto, estos datos demostraban que la expresión de *Rcan1* en el compartimento hematopoyético jugaba un papel importante en el desarrollo de aterosclerosis, a diferencia de lo que ocurría con el desarrollo de AAA.

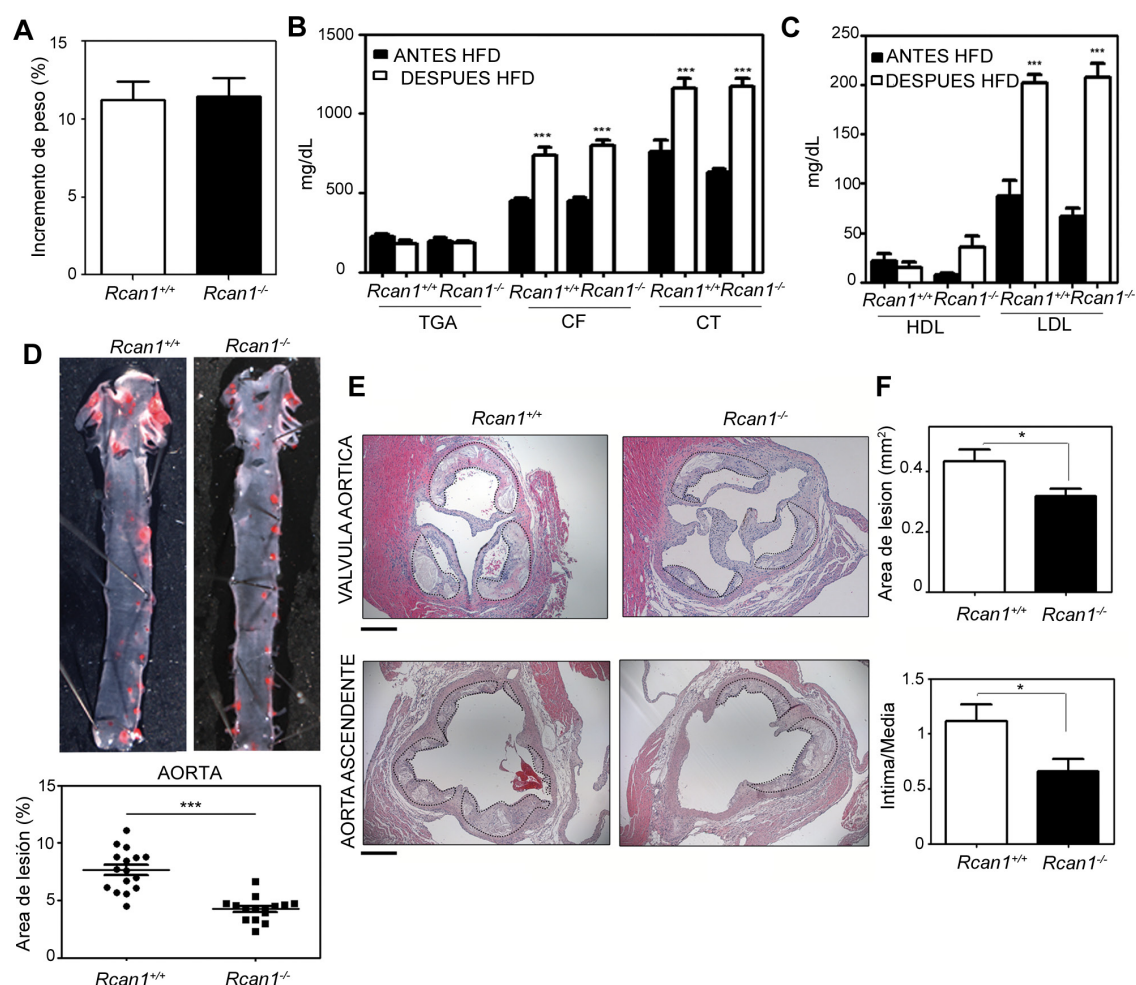


Figura 45. El trasplante de células de médula ósea deficientes en *Rcan1* confiere resistencia al desarrollo de aterosclerosis. Animales *Apoe*^{-/-} fueron trasplantados con medula ósea de ratones *Apoe*^{-/-} (*Rcan1*^{+/+}; n=16) o *Apoe*^{-/-}*Rcan1*^{-/-} (*Rcan1*^{-/-}; n=15) y alimentados con HFD durante 6 semanas. **(A)** Incremento de peso; **(B)** Concentración de triglicéridos (TGA) colesterol libre (CL) y colesterol total (CT) en suero y **(C)** Niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y de baja densidad (LDL) en el suero de estos ratones antes y después de la dieta (medias±SEM). ***p<0.001. **(D)** Tinciones representativas de Oil red en aorta y cuantificación del área de lesión en ratones *Apoe*^{-/-} trasplantados con células de médula ósea de ratones *Rcan1*^{+/+} (n=16) o *Rcan1*^{-/-} (n=15) después de 6 semanas de HFD. Cada punto denota un ratón y las barras horizontales representan la media (barras largas) y la SEM (barras cortas). **(E, F)** Imágenes representativas de HE y cuantificación del área de lesión en **(E)** secciones de válvulas aórticas y en **(F)** secciones de aorta ascendente (medias±SEM). Escala, 200 μ m. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

5. La ausencia de *Rcan1* no altera la actividad CN en tejido aórtico, CMLVs y macrófagos

Dado que *Rcan1* podría actuar como un regulador positivo o negativo de la actividad de CN, determinamos el efecto de su ausencia sobre la actividad CN en tejido aórtico y en cultivos de CMLVs y macrófagos. Observamos que la falta de *Rcan1* no produce

cambios significativos en el estatus de desfosforilación de los miembros de NFAT o en su localización subcelular, tanto en CMLVs no estimuladas como en las estimuladas con AngII o Ionóforo (Fig. 46A-B). La ausencia de *Rcan1* tampoco parece afectar a la actividad CN medida a través de la desfosforilación de su sustrato RII, ya que tanto los tejidos aórticos como las CMLVs de *Rcan1*^{-/-} y *Rcan1*^{+/+} muestran niveles de actividad CN similares (Fig. 46C). Además el patrón de activación de NFAT *in vivo* era similar en tejido aórtico de *Rcan1*^{+/+} y *Rcan1*^{-/-} (Fig. 46D).

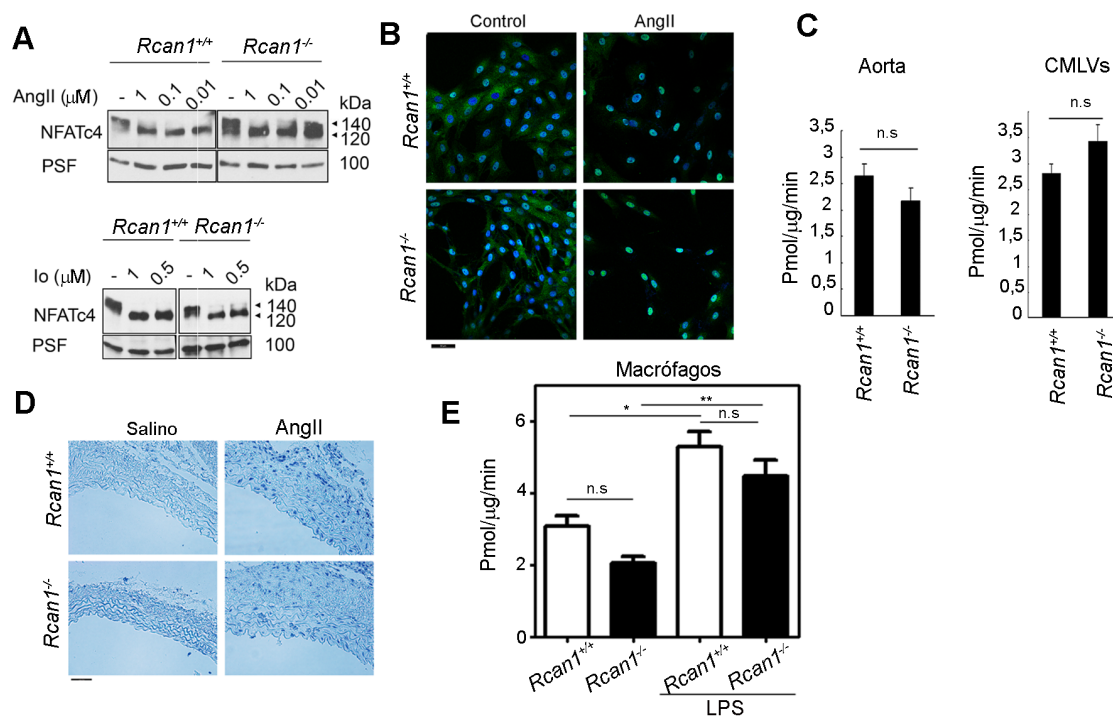


Figura 46: La falta de *Rcan1* no altera la actividad fosfatasa de CN en CMLVs en macrófagos y en tejido aórtico. (A) Inmunoblot de NFATc4 y de PSF con extractos de CMLVs tratadas con las dosis de AngII o Io indicadas durante 1h. Las puntas de flecha indican los diferentes grados de fosforilación de NFATc4. Se muestra un experimento representativo de 3-5 realizados. (B) Imágenes representativas de 4 experimentos independientes de IF de NFATc4 realizada sobre CMLVs *Rcan1*^{+/+} y *Rcan1*^{-/-} tratadas o no con AngII (10⁻⁶ M) durante 1 h. Escala, 50 μm. Actividad fosfatasa de CN frente al fosfopéptido RII, medida en (C) extractos de tejido aórtico o de CMLVs obtenidas de animales *Rcan1*^{+/+} o *Rcan1*^{-/-}, y en (E) macrófagos peritoneales estimulados o no con LPS (1μM) durante 20 min. Los valores son la media ± SEM de triplicados realizados por cada condición en 4 experimentos independientes. (D) Imágenes representativas de análisis de southwestern de 4 experimentos realizados con la sonda de NFAT activo en tejido aórtico de ratones *Rcan1*^{+/+} y *Rcan1*^{-/-} tratados durante 14 d con salino o AngII mediante minibombas osmóticas. Escala, 50μm. *p<0.05; **p<0.01; n.s, no significativo.

Por otra parte, el ensayo enzimático de la actividad fosfatasa de CN frente al fosfopéptido RII en macrófagos peritoneales estimulados o no con LPS demostró que la ausencia de *Rcan1* en estas células tampoco producía cambios significativos en la actividad CN (Fig. 46E).

En conjunto, estos resultados indican que la deficiencia de *Rcan1* no afecta significativamente a la actividad fosfatasa de CN en los tejidos y células analizados, sugiriendo que los efectos de *Rcan1* sobre la remodelación patológica de la pared vascular podrían ser independientes de su capacidad reguladora de CN.



DISCUSIÓN

El remodelado que sufre la pared arterial es un evento central en procesos patológicos como la formación de aneurismas, la restenosis o la aterosclerosis (Pasterkamp et al., 2000). Este remodelado conlleva principalmente cambios en el tamaño de la capa media, que producen la reducción o el incremento del lumen del vaso.

El control farmacológico de factores de riesgo como la diabetes, la hiperlipidemia, o el aumento de la presión arterial (hipertensión) puede ralentizar el desarrollo de algunos de estos procesos patológicos como la formación de aneurismas y la aterosclerosis. Sin embargo, no existe un tratamiento definitivo que permita prevenir la progresión de pequeñas lesiones. En este sentido, el estudio de moléculas y rutas de señalización implicadas en procesos de remodelado vascular es necesario para mejorar el conocimiento de estas patologías y podría servir para desarrollar tratamientos alternativos preventivos, que permitan evitarlas, o para mejorar las terapias actuales.

La ruta CN/NFAT ha sido implicada principalmente en procesos inflamatorios y de respuesta inmune. Asimismo, existen muchos estudios encaminados a investigar los mecanismos de activación de esta ruta y las implicaciones de su activación en células del sistema inmune. Aunque la ruta CN/NFAT también ha sido implicada en algunas patologías cardiovasculares, poca es la información relacionada con su función en células de la vasculatura.

Mediante el uso de modelos murinos de remodelado de la pared vascular en esta tesis hemos demostrado que la proteína Rcan1, molécula regulada por el eje CN/NFAT, desempeña un papel esencial en el desarrollo y progresión de patologías como el aneurisma abdominal aórtico, la restenosis y la aterosclerosis.

A diferencia de otros resultados anteriores, en los que evidencian que los mecanismos que promueven los procesos de remodelado en la patología de restenosis y AAA son diferentes, nosotros demostramos que existen mecanismos de actuación comunes como el mediado por CN. La activación de la ruta CN/NFAT por estimulación con AngII induce la expresión de la proteína Rcan1-4, que tiene un papel esencial en la migración de CMLVs, evento común para el desarrollo y progresión de AAA, restenosis y aterosclerosis. Asimismo, en este trabajo también demostramos que RCAN1 tiene un papel clave en aterosclerosis como molécula pro-aterogénica, ya que se encuentra inducido tanto en lesiones humanas como en las procedentes de ratones y que su deficiencia reduce significativamente el desarrollo de placas de ateroma. Además, nuestros resultados apuntan a que el papel desempeñado por Rcan1 en AAA y restenosis podría estar restringido al compartimento vascular, mientras que en aterosclerosis Rcan1 parece

desempeñar un papel fundamental en células hematopoyéticas, ya que el trasplante de células de médula ósea *Rcan1*^{-/-} confiere resistencia a su desarrollo en ratones *Apoe*^{-/-} irradiados. En particular, hemos demostrado que *Rcan1* media la expresión de CD36 en macrófagos y la formación y migración de células espumosas. También hemos demostrado que la falta de *Rcan1* promueve la expresión de genes anti-inflamatorios, como *IL-10* o *Mrc1*, tanto en macrófagos como en lesiones.

Con estos datos, proponemos que *Rcan1* podría ser una diana terapéutica para el tratamiento de estas enfermedades.

CN en migración y proliferación de CMLVs

Angiotensina II, uno de los estímulos vasculares más importantes como promotor de la migración y proliferación de CMLVs, es capaz de estimular la ruta CN/NFAT en estas células. Hemos mostrado que AngII induce sustancialmente *in vivo* e *in vitro* la activación de los factores de transcripción NFATs en CMLVs a través del receptor AT₁ y que esta activación es sensible a la inhibición de CN. Además, hemos demostrado que la CN tiene una función esencial en la inducción de la migración de CMLVs por AngII.

Por otra parte, la AngII ha sido ampliamente estudiada en patologías cardiovasculares y se ha mostrado su efecto estimulador en hipertrofia e hiperplasia de CMLVs. Sin embargo, hay datos conflictivos respecto al mecanismo de actuación de AngII en estas células y sobre su capacidad para activar la proliferación. Aunque algunos grupos han descrito que AngII aumenta la síntesis de DNA (Guo et al., 2009; Nagata et al., 2004; Sayeski and Ali, 2003; Watanabe et al., 2001), algunos de estos estudios también muestran que AngII no incrementa el número de células (Watanabe et al., 2001). A su vez, existen estudios de otros grupos de investigación mostrando que AngII no es un buen inductor de proliferación en CMLVs (Berk et al., 1989; Geisterfer et al., 1988; Guo et al., 2009; Owens, 1989). En consonancia con estos últimos, nuestro estudio muestra que aunque AngII induce claramente la migración de CMLVs, sus efectos sobre la proliferación de estas células son bastante modestos llegando, en ocasiones, a ser inexistentes. Teniendo en cuenta que la estimulación con AngII activa la síntesis de otros factores de crecimiento, como pueden ser el PDGF (Naftilan et al., 1989), el ET-1 (Emori et al., 1989; Scott-Burden et al., 1991) o el TGF- β (Itoh et al., 1990; Koibuchi et al., 1993), no descartamos que AngII pudiera potenciar de forma indirecta la proliferación de CMLVs *in vivo*. En este sentido, sería interesante investigar el posible papel de *Rcan1* como mediador de la proliferación de CMLVs inducido por AngII *in vivo*.

Rcan1 como mediador de la migración de CMLVs y macrófagos cargados con LDLox

Son muchas las rutas de señalización a través de las que AngII puede actuar después de su unión a los receptores de membrana. Entre ellas se incluyen aquellas mediadas por diacilglicerol y proteína quinasa C; Janus quinasa 2; la familia de la quinasa Src y sus efectores Akt y la proteína quinasa activadora de mitógeno; y las fosfolipasas PLD y PLA2, las cuales inducen la producción de especies reactivas de oxígeno. Asimismo, AngII también impulsa la formación de inositol-trifosfato (IP3), el consiguiente aumento de Ca^{2+} intracelular y, como consecuencia, la activación de CN.

Trabajos previos, centrados en el análisis del patrón de expresión génica de CMLVs estimuladas con distintos estímulos proliferativos y migratorios como PDGF- β o suero, demostraron que existía una regulación de un gran número de genes, entre los que se encontraban genes dependientes de CN (Lee et al., 2010). Nosotros también hemos observado que AngII regula la expresión de >1.500 genes en CMLVs, pero es destacable que solo 11 de estos genes son sensibles a CsA. Estos genes son, por ello, candidatos a ser regulados por CN, lo que sugiere un alto grado de especificidad en la regulación de la expresión génica por CN en respuesta a AngII. Además, nuestros resultados muestran que solo uno de estos genes, Rcan1, es fuertemente inhibido por CsA. Los datos obtenidos en experimentos *in vitro* indican que la inducción de Rcan1 por AngII afecta principalmente a la isoforma Rcan1-4. Además, mediante el uso de inhibidores farmacológicos de CN y el uso de los péptidos lentivirales inhibidores de CN mostramos que, a pesar de las numerosas rutas de señalización activadas por AngII, la mediada por CN es esencial para la inducción de Rcan1-4 y para la migración de CMLVs.

La importancia de Rcan1 en migración celular ya ha sido anteriormente descrita en otros tipos celulares. En este trabajo, además de demostrar que Rcan1 es esencial para la migración de CMLVs en respuesta a AngII, también mostramos que Rcan1 regula la migración de macrófagos cargados con LDLox. Durante la resolución de la inflamación los macrófagos migran desde las zonas de inflamación, donde fagocitan patógenos, toxinas o células apoptóticas, hacia el torrente sanguíneo o hacia los nódulos linfáticos (Podrez et al., 2000). Sin embargo, los macrófagos cargados de LDLox en la placa de ateroma, no son capaces de salir de la lesión después de fagocitar los lípidos y no se produce la resolución de la inflamación (Angeli et al., 2004). De hecho, se ha propuesto que la retención de los macrófagos en la placa se debe a la incorporación de LDLox (Park et al., 2009). Nuestros datos sugieren que Rcan1 podría facilitar que los macrófagos cargados con LDLox se queden atrapados en la lesión, ya que Rcan1 aumenta la captación de estas partículas, la

expansión firme de estos macrófagos (*spreading*) y la inhibición de su migración. Si bien todos estos datos indican que Rcan1 es un regulador importante de la migración celular, habría que estudiar más a fondo los mecanismos implicados para dilucidar cómo Rcan1 media estos procesos.

Rcan1 en la formación de AAA y de neoíntima

Tanto la proliferación como la migración celular son esenciales en patologías que cursan con remodelado de la pared vascular. Sin embargo, los mecanismos precisos por los que se producen el crecimiento de la neoíntima o el desarrollo de AAA no han sido claramente definidos. En trabajos anteriores se había descrito que AngII exacerba el crecimiento de la neoíntima en arterias de ratas dañadas (Schwartz et al., 1995; van Kleef et al., 1996) y que este incremento de daño estaba mediado por la acción de Akt (Li et al., 2005). Sin embargo, aunque se ha implicado a la ruta CN/NFAT en el crecimiento de la neoíntima después de un daño (Liu et al., 2005; Satonaka et al., 2004), nuestro estudio ha sido el primero en identificar un nexo entre las acciones de AngII y la ruta CN/NFAT en este proceso. Usando el modelo de daño femoral en ratón, hemos mostrado que CsA inhibe no solo el remodelado causado por el daño mecánico de la introducción de la guía metálica en la arteria, si no también el daño que pronunciadamente se incrementa por el tratamiento con AngII. Es destacable que nuestros datos aportan además un mayor conocimiento del mecanismo por el que CN media el daño inducido por AngII. Así, la identificación de *Rcan1-4* como gen activado por AngII y sensible a CsA en CMLVs, junto con los datos de que los ratones *Rcan1*^{-/-} muestran protección ante la formación de neoíntima inducida por daño, en presencia o ausencia de AngII, indican que Rcan1 es un mediador clave en el remodelado de la pared vascular en el proceso de restenosis.

En el caso de los aneurismas abdominales aórticos inducidos por AngII, aunque de nuevo el mecanismo por el que se producen no está bien definido, un estudio reciente ha mostrado que la ciclofilina A secretada por las CMLVs media la formación de AAA inducida por AngII en ratones *Apoe*^{-/-} (Sato et al., 2009). Como se indicó en la introducción, CsA se une a ciclofilina A y es este complejo, no ciclofilina por sí sola, el que se une a CN e inhibe su actividad (Liu et al., 1991). La inhibición que CsA ejerce sobre el desarrollo de AAA podría explicarse por tanto por varios procesos: porque bloquee la secreción de ciclofilina A o interfiera en su actividad, o porque inhiba directamente a CN. Dado que nuestros resultados muestran que la infección con lentivirus LxVP, el cual inhibe la actividad fosfatasa de CN independientemente de ciclofilina A, produce el mismo fenotipo que el tratamiento con CsA, proponemos que CsA reduce la formación de aneurismas

inhibiendo la actividad fosfatasa de CN. Además, nuestros datos han sido apoyados por resultados de estudios recientes en el modelo de formación de AAA en rata por infusión de elastasa, en los que se muestra que la administración de CsA en tratamientos cortos estabilizaba el crecimiento de AAA (Dai et al., 2011). Si bien resultados previos evidencian que los mecanismos implicados en procesos de remodelado en la patología de restenosis y AAA son diferentes, nuestros resultados apuntan a la existencia de al menos una ruta de actuación común. AngII promueve la migración de CMLVs, lo cual supone un evento crítico en el desarrollo y progresión de estas patologías (Casscells, 1992; Curci, 2009; Schwartz, 1997). Además, AngII activa la expresión de Rcan1-4 en la formación de neoíntima y aneurismas. Por lo tanto, es una hipótesis verosímil que la activación de CN por AngII en CMLVs induce Rcan1-4 y que esta inducción desempeña un papel esencial en el desarrollo de estas patologías vasculares regulando la migración de CMLVs.

Rcan1 como mediador del desarrollo de placa de aterosclerosis en humano vs ratón

Aunque la enfermedad aterosclerótica difiere en varios aspectos entre humanos y modelos de ratón, también muestra algunas características críticas comunes. En este sentido, nuestros resultados sugieren que RCAN1 puede ser un mediador común en el desarrollo de la aterosclerosis en ratones y humanos. El análisis de la expresión de RCAN1 en tejido humano lesionado muestra niveles altos de ambas isoformas sugiriendo que las dos podrían estar inducidas. Sin embargo, solo Rcan1-4 parece ser inducido por LDLox *in vitro* en macrófagos, células endoteliales, CMLVs y tejido lesional de ratón. Estos resultados podrían indicar que la expresión de RCAN1-1 fuera inducible en muestras humanas de ateroma, a pesar de que su expresión se considera normalmente constitutiva. Alternativamente, el aumento de los niveles de RCAN1-1 en la placa humana de ateroma podría ser debido al reclutamiento de una población de células a la zona de la lesión que constitutivamente expresara niveles de RCAN1-1 superiores a los de las células residentes. En este caso, el reclutamiento de esa población no se produciría en el modelo de ratón o, aunque se produjera el reclutamiento, esas células expresarían niveles de Rcan1-1 similares a los de las poblaciones residentes.

Contribución de Rcan1 de distintos compartimentos celulares al remodelado vascular

No debería asumirse que las células de la capa media son las únicas células vasculares que están participando en el remodelado vascular inducido por AngII. Las células

endoteliales, y las células de la adventicia, como leucocitos residentes o fibroblastos, también tienen un papel esencial durante el remodelado vascular. De hecho, la adventicia ha recibido una especial consideración en los últimos años y, de hecho, se ha propuesto que provee a la capa media con células y moléculas capaces de influenciar el remodelado vascular (Maiellaro and Taylor, 2007). En particular, se ha observado que durante la respuesta a un daño vascular las células residentes en la adventicia (células inmunes y fibroblastos) pueden reprogramarse para adaptarse a las características y necesidades de ese nuevo ambiente (Maiellaro and Taylor, 2007). Estudios llevados a cabo en modelos de restenosis han mostrado que durante este proceso existen cambios importantes tanto en el tamaño como en la composición de esta capa (Shi et al., 1996; Wilcox et al., 1996). En la patofisiología del AAA se ha descrito que existe un reclutamiento de macrófagos hacia la adventicia en los eventos iniciales (Gavrilu et al., 2005). Ello desencadena la llegada de oleadas de linfocitos y nuevos macrófagos que seguirían infiltrando la pared y favoreciendo el desarrollo de la enfermedad (Daugherty et al., 2000). Durante los procesos de remodelado vascular, también los fibroblastos se activan y reprograman para permanecer en la adventicia como células proliferativas y con características no migratorias o para convertirse en miofibroblastos, células fenotípicamente parecidas a las de músculo liso vascular (Sartore et al., 2001). Por su parte, durante las mismas condiciones de remodelado vascular, las CMLVs de la media muestran características estructurales y funcionales parecidas a una célula inmadura y poco diferenciada, que se hace difícilmente distinguible de un miofibroblasto (Owens, 1995; Sartore et al., 1999), ya que ambas células (miofibroblastos y CMLVs activas) expresan marcadores como SMA y SM22 (Sartore et al., 2001).

En nuestro trabajo mostramos que en los AAA la presencia de NFAT activo y la inducción de la expresión de Rcan1 se producen tanto en CMLVs como en endotelio y en células de la adventicia. En la adventicia, la expresión de Rcan1 coincide con zonas del aneurisma en las que se observan células positivas para vimentina y actina de células musculares (SMA), sugiriendo su presencia en fibroblastos, miofibroblastos y/o CMLVs activadas. Asimismo, también la observamos en zonas con tinción específica de CD3 y Mac3, lo que indicaría su presencia en linfocitos y macrófagos infiltrantes. Estos resultados sugieren que la expresión de Rcan1 en estos tipos celulares podría estar relacionada con el desarrollo de AAA. Sin embargo, como hemos mostrado, la delección de Rcan1 en células hematopoyéticas no previene la formación de aneurismas inducidos por AngII, lo que indicaría que la expresión de Rcan1 en estas células no es esencial para la formación de AAA. Dado que la migración de CMLVs inducida por AngII requiere de la presencia de Rcan1 y que este proceso es esencial en el remodelado del vaso, proponemos que la expresión de Rcan1 en CMLVs o

miofibroblastos podría ser crítica para el remodelado vascular en este modelo. Aun así, no excluimos que la expresión de Rcan1 en otras células como endotelio o fibroblastos pudiera contribuir también a este remodelado.

Resulta de especial interés que, aunque la presencia de Rcan1 en células hematopoyéticas no sea relevante para el desarrollo de AAA, su expresión en estas células tenga un papel fundamental en la progresión de la aterosclerosis. Es posible que Rcan1 sea relevante para que las células hematopoyéticas lleven a cabo alguna función esencial durante el desarrollo de la placa de ateroma, que no tenga lugar durante el desarrollo de los otros procesos de remodelado de la pared vascular. Uno de estos eventos imprescindibles durante el desarrollo de la placa de ateroma es la formación de células espumosas. Dado que este evento no es necesario para los aneurismas y que Rcan1 es un mediador central de este proceso, proponemos que ese papel relevante de Rcan1 y distintivo entre aterosclerosis y aneurisma podría ser precisamente el de la formación de células espumosas.

Por otro lado, la inducción de Rcan1 durante la aterosclerosis no solo tiene lugar en macrófagos, sino también en CMLVs y células endoteliales. Dada la relevancia de las células endoteliales (Ross, 1999) y de las CMLVs (Libby et al., 2011) en la formación de ateromas y del papel de Rcan1 en migración de CMLVs, no podemos descartar que Rcan1 expresado en CMLVs y células endoteliales desempeñe, al igual que los macrófagos, un papel importante en la progresión de la aterosclerosis. Para definir claramente la aportación de Rcan1 en cada una de estas poblaciones celulares será necesario generar ratones en los que la expresión de Rcan1 pueda deleccionarse específicamente en cada una de ellas. Por otra parte, aunque la mayor parte de leucocitos que se encuentran tanto en las lesiones de ratón como en las humanas son macrófagos, también pueden encontrarse linfocitos, neutrófilos y mastocitos (Woollard and Geissmann, 2010). Sería interesante determinar si Rcan1 también podría desempeñar un papel pro-aterogénico en estos tipos celulares.

Rcan1 como regulador de fenotipo de macrófagos lesionales en aterosclerosis

Nuestros resultados muestran, tanto *in vivo* como *in vitro*, que Rcan1 es una molécula pro-aterogénica, además de inductora de remodelado vascular en AAA y restenosis. Hemos descrito que su deficiencia desactiva mecanismos importantes para el desarrollo de la patología aterosclerótica. De esta forma, a través de su capacidad para regular la expresión del receptor de LDLox CD36, hemos demostrado que Rcan1 está implicado en la captación de estas partículas en macrófagos. También parece regular la emigración

de macrófagos fuera de la placa de ateroma. Además, la deficiencia en Rcan1 promueve la expresión de marcadores fenotípicos anti-inflamatorios, como IL-10 o Mrc1, tanto en macrófagos *in vitro* como en lesiones.

Nuestros resultados muestran que en placas de ateroma de animales *Apoe^{-/-}Rcan1^{-/-}* hay poca superficie total teñida con Oil Red, así como bajo contenido en lípidos extracelulares en lesiones. Estos resultados son consistentes con los obtenidos *in vitro* mostrando una menor captación de LDLox en ausencia de Rcan1. Notablemente, los macrófagos *Apoe^{-/-}Rcan1^{-/-}* y *Apoe^{-/-}* captan moléculas de LDL nativas de forma similar. Teniendo en cuenta que la captación de LDL nativas y modificadas ocurre por diferentes receptores (Greaves and Gordon, 2009), nuestros datos nos llevaron a estudiar el papel de Rcan1 en la regulación de la expresión o actividad de receptores específicos para LDL modificadas. Así, mostramos que en macrófagos deficientes para Rcan1 hay menor expresión del receptor CD36, principal receptor en la captación de formas modificadas de LDL (Febbraio et al., 2000). Asimismo, la expresión forzada de Rcan1 en células obtenidas de ratones *Rcan1^{-/-}* incrementa tanto la expresión de CD36 como la capacidad de formación de células espumosas. El reciclaje de colesterol en células cargadas con LDL modificadas también se ve incrementado ligeramente en los macrófagos *Apoe^{-/-}Rcan1^{-/-}*. Sin embargo, los niveles de los transportadores implicados en estos procesos no están significativamente aumentados ni en células ni en lesiones, por lo que la contribución biológica de Rcan1 a la regulación del reciclaje de colesterol es dudosa.

Nuestros resultados sugieren que Rcan1 podría participar en un ciclo de retroalimentación positiva durante la progresión de la aterosclerosis a través de la regulación de las características de los macrófagos. Rcan1 mediaría la acumulación de partículas de LDLox en macrófagos, lo que inhibiría la salida de células espumosas de la lesión y facilitaría una mayor incorporación de LDLox en estas y el reclutamiento de macrófagos adicionales, en los que también se induciría la expresión de Rcan1. Este proceso favorecería la formación del núcleo necrótico y, por tanto, la progresión de la placa de ateroma.

La importancia que Rcan1 tiene en los macrófagos lesionales de la placa de aterosclerosis no solo radica en la regulación de la formación de células espumosas, si no también en su capacidad para regular su fenotipo inflamatorio. La mayoría de los macrófagos que se encuentran en placas de ateroma en estadios avanzados muestran un fenotipo pro-inflamatorio o tipo M1, sin embargo, en etapas más tempranas es más frecuente observar macrófagos con un fenotipo alternativo o tipo M2 (Khallou-Laschet et al., 2010). Además, estudios recientes con placas de ateroma avanzadas muestran la presencia de macrófagos con un fenotipo que difiere de M1 y M2 y que tienen aumentada su capacidad

fagocítica y quimiotáctica (Kadl et al., 2010). El análisis de la distribución de CD163 y MRC1 (potenciales marcadores de M2) en placas de ateroma de carótida humana sugiere que podría haber al menos tres fenotipos diferentes de macrófagos presentes en las placas (Bouhlef et al., 2007).

Hemos mostrado que, los macrófagos deficientes en *Rcan1* adquieren algunos rasgos fenotípicos de células anti-inflamatorias. Nuestros resultados muestran expresión elevada de IL-10 y *Mrc1*, sin cambios en la expresión de iNos en lesiones de ratones deficientes en *Rcan1*. Sin embargo, en macrófagos deficientes en *Rcan1* hay incremento de iNos *ex vivo*, mientras que el resto de marcadores permanecen con expresiones parecidas a lo observado *in vivo* en placa. Estas diferencias entre *ex vivo* e *in vivo* podrían estar relacionadas con los protocolos de análisis y extracción. En concreto, para la extracción de macrófagos *ex vivo* se emplea tioglicolato, un estímulo pro-inflamatorio que podría inducir la expresión de iNos independientemente de *Rcan1*.

En estudios previos, se describió que la eliminación de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 en ratones (*IL-10^{-/-}*) promovía el desarrollo de la placa de ateroma y que la administración de IL-10 por vía intramuscular en estos ratones reducía tanto la extensión como la severidad de las placas (Mallat et al., 1999). Asimismo, la administración sistémica de IL-10, usando adenovirus en animales deficientes para receptor de LDL (Liu et al., 2006), o intramuscular en animales *Apoe^{-/-}* (Yoshioka et al., 2004), inhibía el desarrollo de aterosclerosis.

Nuestros resultados sugieren que la ausencia de *Rcan1* promovería la presencia de macrófagos con propiedades anti-inflamatorias en placa de ateroma, incluyendo la expresión elevada de IL10, lo que podría dificultar la progresión de la placa. Por el momento no podemos saber si las células productoras de IL-10 detectadas en las lesiones de animales *Rcan1^{-/-}* encajarían dentro del perfil de macrófagos tipo M2 o si se trataría de un tipo de macrófagos distinto a los descritos. Los altos niveles de expresión de *Mrc1*, *Arginase-1* y los bajos niveles de *Mcp1*, así como la elevada actividad fagocítica y la baja capacidad de presentación antigénica, son características comunes que comparten con los macrófagos de fenotipo M2. Sin embargo, los macrófagos M2 tienen más capacidad de captación de LDLox que los M1 (van Tits et al., 2011), lo que no estaría en consonancia con nuestros resultados, ya que los macrófagos *Apoe^{-/-}Rcan1^{-/-}* captan menos LDLox. El conjunto de estos resultados sugiere que la falta de *Rcan1* promovería la polarización de macrófagos hacia un fenotipo diferente al de tipo M1 y M2, y que este fenotipo de macrófagos lesionales se encontraría en concordancia con un fenotipo más cercano al anti-inflamatorio.

La función de Rcan1 en remodelado vascular no está mediada por cambios en la actividad CN

Nuestros resultados indican que Rcan1 actuaría como promotor o iniciador de las patologías vasculares aquí estudiadas. También mostramos que la actividad de CN es fundamental para el desarrollo de aneurismas y neoíntima y para la inducción de Rcan1. Estos resultados podrían parecer contradictorios porque Rcan1 fue descrito originalmente como un regulador negativo de la actividad CN (Davies et al., 2007; Rothermel et al., 2000). Sin embargo, otros estudios han mostrado que Rcan1 no siempre actúa de esta manera y que en ocasiones puede actuar como un inductor de la actividad CN (Kingsbury and Cunningham, 2000; Vega et al., 2003b). Este comportamiento dual de Rcan1 podría explicarse de varias maneras. Por una parte, la regulación de la actividad CN por Rcan1 podría depender del tipo celular, del tejido o del estímulo. Por otra parte, Rcan1 podría activar o inhibir a CN según el momento específico del desarrollo o de la fase de la enfermedad. En este sentido, se ha descrito que modificaciones post-traduccionales de Rcan1, como la fosforilación o la ubiquitinación, provocan cambios funcionales en Rcan1, haciendo que éste sea o activador de CN/NFAT o inhibidor (Liu et al., 2009; Shin et al., 2011). En nuestros resultados observamos que la deficiencia de Rcan1 en CMLVs o en tejido aórtico no causa diferencias en la actividad CN, medida por la desfosforilación del péptido RII como sustrato de CN. Además, la deficiencia en Rcan1 no afecta a los niveles basales de NFAT desfosforilado, a su localización subcelular, a su capacidad de unión al DNA o a cambios en estos parámetros, tanto en CMLVs como en las arterias estimuladas con AngII. Asimismo, observamos los mismos resultados analizando la actividad calcineurina de macrófagos peritoneales, ya que en condiciones basales o de estimulación con lipopolisacárido (LPS), la deficiencia de Rcan1 en macrófagos no tiene efectos significativos en la actividad CN.

Por todo esto, nuestros datos sugieren que Rcan1 media la regulación de remodelado patológico en AAA, restenosis y aterosclerosis sin interferir en la actividad calcineurina. Rcan1 podría regular estas patologías a través de su interacción con otras proteínas. De hecho, se ha descrito que Rcan1 interacciona con proteínas importantes en señalización y transcripción, como Raf-1 (Cho et al., 2005), 14-3-3 (Abbasi et al., 2006) y una quinasa inductora de NF κ B (Lee et al., 2008). El estudio del interactoma de Rcan1 en CMLVs y en macrófagos podría resultar de utilidad para esclarecer estas cuestiones en el futuro.

Rcan1 como diana terapéutica en remodelado vascular

Esperamos que los estudios descritos en esta tesis puedan proporcionar resultados potencialmente importantes para el desarrollo de terapias no quirúrgicas de prevención

de restenosis y de inhibición del desarrollo de aterosclerosis y AAA. Cuando se observan síntomas claros de oclusión de una arteria, el paciente puede ser intervenido, realizándole una angioplastia y, en la mayoría de los casos, la implantación de un stent recubierto. Aunque esta técnica ha mejorado notablemente la prevención y el tratamiento de la restenosis (Iakovou et al., 2005a), en algunos casos persiste cierto nivel de oclusión arterial y el consecuente riesgo para la vida del paciente (Waseda et al., 2009). Algunos de estos stent se recubren con fármacos inmunosupresores o agentes citoestáticos, pero estos fármacos son relativamente poco específicos (Bhatia et al., 2004; Marx and Marks, 2001) y su uso se asocia con un riesgo de trombosis a largo plazo (Iakovou et al., 2005b). Normalmente, los tratamientos de la aterosclerosis o los AAA van encaminados al tratamiento de alteraciones específicas relacionadas con su progresión, como la hipertensión arterial, la hipercolesterolemia o la diabetes, pero no existe ningún tratamiento específico definitivo para curar estas enfermedades (Chaikof et al., 2009). En el caso de los AAA detectados en estadios avanzados, existe la posibilidad de la intervención quirúrgica, pero la mortalidad en un periodo de 30 días es del 5% (Sakalihasan et al., 2005). Por todo esto, sería conveniente el desarrollo de terapias eficientes que permitan el tratamiento de estas enfermedades en estadios tempranos de su desarrollo.

Aunque la inhibición farmacológica de CN con CsA previene la formación de neoíntima y el desarrollo de AAA inducida por AngII (descrito en este trabajo) y tiene un papel anti-aterogénico (Kockx et al., 2010), el uso de este fármaco en humanos requiere una atención especial debido a los severos efectos secundarios que produce, entre los que se incluye neurotoxicidad, diabetes, e hipertensión. La CsA afecta a la actividad de CN y, por tanto, a todo el amplio espectro de cascadas de señalización regulado por esta fosfatasa. Este amplio espectro de actuación podría explicar algunos de los efectos secundarios que se observan, incluyendo la toxicidad, ya que solo parte de la toxicidad producida por CsA depende de su acción sobre CN (Kiani et al., 2000; Martinez-Martinez and Redondo, 2004). Una inhibición más específica de CN se puede alcanzar con los péptidos que interactúan con ella, aunque estos péptidos, aun siendo más específicos que CsA, también inhiben la actividad fosfatasa de la CN y, por tanto, bloquean su interacción con otros sustratos (Aramburu et al., 1999; Martinez-Martinez et al., 2006).

Por lo tanto, la identificación de moléculas efectoras por debajo de la ruta de CN, con un espectro de actuación más acotado y, además, comunes en su actuación en varias patologías, como es el caso de RCAN1, podría facilitar el desarrollo de terapias basadas en la inhibición de su expresión o de su función, que podrían resultar más eficientes, prometedoras y con menos efectos deletéreos que el uso de drogas inmunosupresoras. Además, el estudio proteico e interactómico de Rcan1 podría servir en el futuro para

identificar dianas adicionales de intervención terapéutica. Eventualmente, estas terapias podrían servir para inhibir significativamente el desarrollo de estas enfermedades incluso antes de la aparición de síntomas clínicos severos.

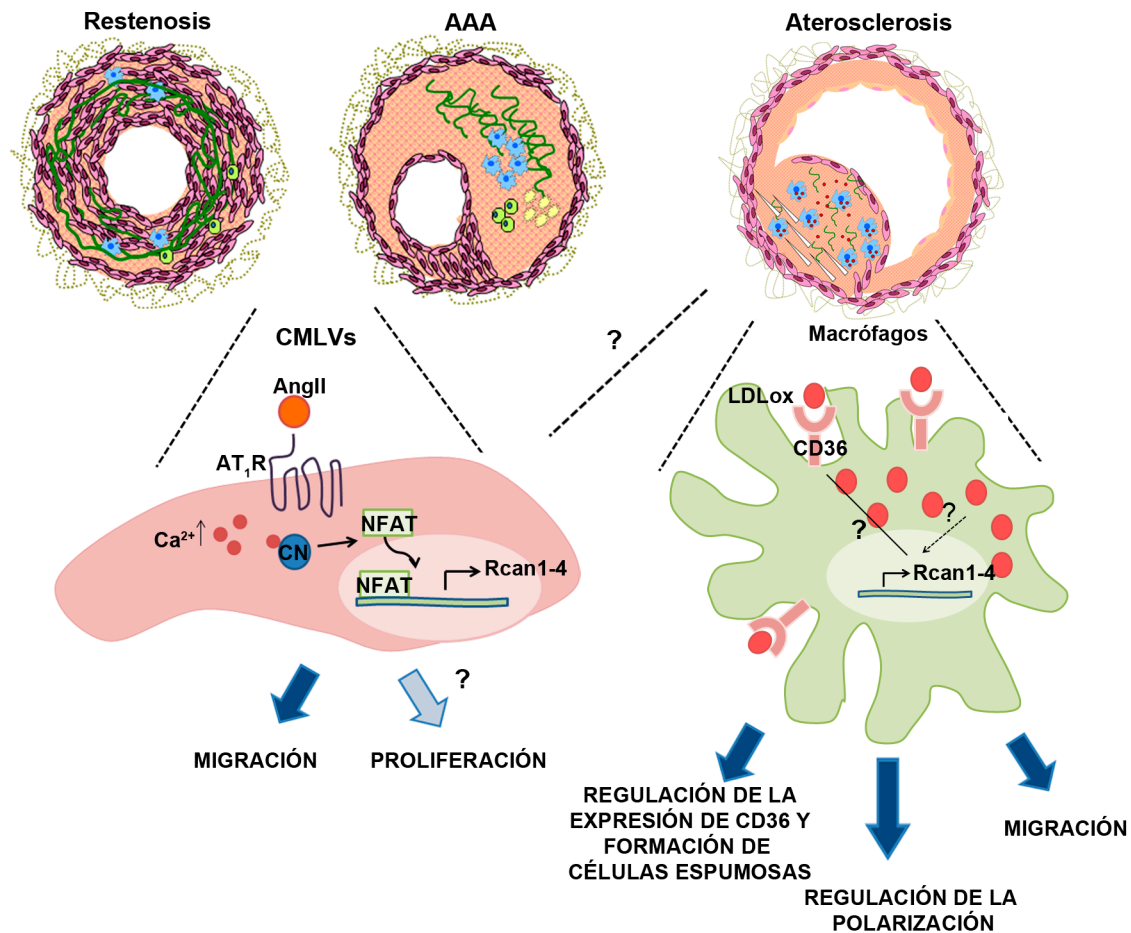


Figura 47. Modelo que representa la contribución de Rcan1 en las patologías de restenosis, AAA y aterosclerosis. En restenosis y AAA, Rcan1 sería importante en las CMLVs. En estas células, AngII produciría aumento de Ca^{2+} intracelular a través del receptor AT_1 , que activaría CN y ésta, a su vez, desfosforilaría el factor de transcripción NFAT, que se translocaría al núcleo donde induciría la expresión de Rcan1-4. Rcan1-4 mediaría la migración inducida por AngII en estas células, pero no queda claro su papel en proliferación. En aterosclerosis, Rcan1 sería importante en macrófagos, aunque no descartamos su participación también en la migración de CMLVs. En macrófagos, la expresión de Rcan1-4 se induciría por estimulación con LDLox. Rcan1 regularía la expresión del receptor CD36 en macrófagos y la formación de células espumosas, así como la emigración de los macrófagos de la placa y su polarización.



CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis se ha descrito el papel esencial de la ruta AngII/CN/NFAT en los procesos de remodelado patológico de la pared vascular. Además, hemos identificado a la proteína Rcan1 como molécula mediadora de las patologías de formación de Aneurismas Aórticos Abdominales, Restenosis y Aterosclerosis.

Concretamente concluimos que:

1. La estimulación con AngII, activa la ruta CN/NFAT en CMLVs *in vitro* y en la pared vascular.
2. La ruta CN/NFAT media la inducción de migración de las CMLVs por AngII.
3. CN media los procesos de remodelado vascular inducido por AngII en modelos de formación de AAA y de crecimiento de neoíntima.
4. La activación de la ruta CN/NFAT es necesaria para la inducción de la expresión de Rcan1-4 por AngII.
5. Rcan1-4 es un mediador esencial en la inducción de migración de CMLVs por AngII.
6. Los ratones deficientes en Rcan1 son resistentes al desarrollo de formación de neoíntima y AAA.
7. La expresión de RCAN1 se induce en lesiones ateroscleróticas humanas y de ratón y promueve la progresión de la enfermedad en un modelo de aterosclerosis inducido por dieta grasa en ratones.
8. Rcan1 actúa como pro-aterogénico regulando la expresión de CD36, la formación de células espumosas, la inhibición de la migración de macrófagos por LDLox y promoviendo la expresión de marcadores anti-inflamatorios en macrófagos y en lesiones ateroscleróticas.
9. La expresión de Rcan1 en células hematopoyéticas es crítica para la aterogénesis, pero no para el desarrollo de aneurismas.

A microscopic image of a tissue section, likely stained with hematoxylin and eosin (H&E). The image shows a dense cellular structure with various shades of pink, red, and blue. The cells are arranged in a somewhat organized manner, with some areas showing more intense staining than others. The overall appearance is that of a histological slide, possibly from a glandular or epithelial tissue.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, S., J.D. Lee, B. Su, X. Chen, J.L. Alcon, J. Yang, R.E. Kellems, and Y. Xia. 2006. Protein kinase-mediated regulation of calcineurin through the phosphorylation of modulatory calcineurin-interacting protein 1. *J Biol Chem* 281:7717-7726.
- Ailawadi, G., C.W. Moehle, H. Pei, S.P. Walton, Z. Yang, I.L. Kron, C.L. Lau, and G.K. Owens. 2009. Smooth muscle phenotypic modulation is an early event in aortic aneurysms. *J Thorac Cardiovasc Surg* 138:1392-1399.
- Alexander, R.W., T.A. Brock, M.A. Gimbrone, Jr., and S.E. Rittenhouse. 1985. Angiotensin increases inositol trisphosphate and calcium in vascular smooth muscle. *Hypertension* 7:447-451.
- Alfranca, A., M.A. Iniguez, M. Fresno, and J.M. Redondo. 2006. Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: role in cardiovascular diseases. *Cardiovascular research* 70:446-456.
- Aliprantis, A.O., Y. Ueki, R. Sulyanto, A. Park, K.S. Sigrist, S.M. Sharma, M.C. Ostrowski, B.R. Olsen, and L.H. Glimcher. 2008. NFATc1 in mice represses osteoprotegerin during osteoclastogenesis and dissociates systemic osteopenia from inflammation in cherubism. *J Clin Invest* 118:3775-3789.
- Allen, A.M., J. Zhuo, and F.A. Mendelsohn. 2000. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens* 13:31S-38S.
- Andersen, H.O., B.F. Hansen, P. Holm, S. Stender, and B.G. Nordestgaard. 1999. Effect of cyclosporine on arterial balloon injury lesions in cholesterol-clamped rabbits: T lymphocyte-mediated immune responses not involved in balloon injury-induced neointimal proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1687-1694.
- Angeli, V., J. Llodra, J.X. Rong, K. Satoh, S. Ishii, T. Shimizu, E.A. Fisher, and G.J. Randolph. 2004. Dyslipidemia associated with atherosclerotic disease systemically alters dendritic cell mobilization. *Immunity* 21:561-574.
- Anidjar, S., J.L. Salzmänn, D. Gentric, P. Lagneau, J.P. Camilleri, and J.B. Michel. 1990. Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation* 82:973-981.
- Apanay, D.C., J.F. Neylan, M.S. Ragab, and D.S. Sgoutas. 1994. Cyclosporine increases the oxidizability of low-density lipoproteins in renal transplant recipients. *Transplantation* 58:663-669.
- Aramburu, J., F. Garcia-Cozar, A. Raghavan, H. Okamura, A. Rao, and P.G. Hogan. 1998. Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol Cell* 1:627-637.
- Aramburu, J., J. Heitman, and G.R. Crabtree. 2004. Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes. *EMBO Rep* 5:343-348.
- Aramburu, J., A. Rao, and C.B. Klee. 2000. Calcineurin: from structure to function. *Curr Top Cell Regul* 36:237-295.
- Aramburu, J., M.B. Yaffe, C. Lopez-Rodriguez, L.C. Cantley, P.G. Hogan, and A. Rao. 1999. Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* 285:2129-2133.
- Asada, S., A. Ikeda, R. Nagao, H. Hama, T. Sudo, A. Fukamizu, Y. Kasuya, and T. Kishi. 2008. Oxidative stress-induced ubiquitination of RCAN1 mediated by SCF β -TrCP ubiquitin ligase. *International journal of molecular medicine* 22:95-104.

- Aubareda, A., M.C. Mulero, and M. Perez-Riba. 2006. Functional characterization of the calcipressin 1 motif that suppresses calcineurin-mediated NFAT-dependent cytokine gene expression in human T cells. *Cellular signalling* 18:1430-1438.
- Baek, K.H., A. Zaslavsky, R.C. Lynch, C. Britt, Y. Okada, R.J. Siarey, M.W. Lensch, I.H. Park, S.S. Yoon, T. Minami, J.R. Korenberg, J. Folkman, G.Q. Daley, W.C. Aird, Z. Galdzicki, and S. Ryeom. 2009. Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1. *Nature* 459:1126-1130.
- Bagatolli, L.A., S.A. Sanchez, T. Hazlett, and E. Gratton. 2003. Giant vesicles, Laurdan, and two-photon fluorescence microscopy: evidence of lipid lateral separation in bilayers. *Methods Enzymol* 360:481-500.
- Baliga, R.R., C.A. Nienaber, E. Bossone, J.K. Oh, E.M. Isselbacher, U. Sechtem, R. Fattori, S.V. Raman, and K.A. Eagle. 2014. The role of imaging in aortic dissection and related syndromes. *JACC Cardiovasc Imaging* 7:406-424.
- Benigni, A., P. Cassis, and G. Remuzzi. 2010. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Mol Med* 2:247-257.
- Berk, B.C. 2001. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev* 81:999-1030.
- Berk, B.C., V. Vekshtein, H.M. Gordon, and T. Tsuda. 1989. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 13:305-314.
- Bhatia, V., R. Bhatia, and M. Dhindsa. 2004. Drug-eluting stents: new era and new concerns. *Postgrad Med J* 80:13-18.
- Bhoiwala, D.L., V. Kannabiran, S.F. Hushmendi, A. Hahn, D.L. Bhoiwala, J.M. Heuring, and D.R. Crawford. 2011. The calcineurin inhibitor RCAN1 is involved in cultured macrophage and in vivo immune response. *FEMS immunology and medical microbiology* 61:103-113.
- Bolstad, B.M., R.A. Irizarry, M. Astrand, and T.P. Speed. 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19:185-193.
- Bouhrel, M.A., B. Derudas, E. Rigamonti, R. Dievart, J. Brozek, S. Haulon, C. Zawadzki, B. Jude, G. Torpier, N. Marx, B. Staels, and G. Chinetti-Gbaguidi. 2007. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab* 6:137-143.
- Burson, J.M., G. Aguilera, K.W. Gross, and C.D. Sigmund. 1994. Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse. *Am J Physiol* 267:E260-267.
- Cano, E., A. Canellada, T. Minami, T. Iglesias, and J.M. Redondo. 2005. Depolarization of neural cells induces transcription of the Down syndrome critical region 1 isoform 4 via a calcineurin/nuclear factor of activated T cells-dependent pathway. *J Biol Chem* 280:29435-29443.
- Cardenas, M.E., R.S. Muir, T. Breuder, and J. Heitman. 1995. Targets of immunophilin-immunosuppressant complexes are distinct highly conserved regions of calcineurin A. *The EMBO journal* 14:2772-2783.
- Casas, C., S. Martinez, M.A. Pritchard, J.J. Fuentes, M. Nadal, J. Guimera, M. Arbones, J. Florez, E. Soriano, X. Estivill, and S. Alcantara. 2001. Dscr1, a novel endogenous

- inhibitor of calcineurin signaling, is expressed in the primitive ventricle of the heart and during neurogenesis. *Mechanisms of development* 101:289-292.
- Casscells, W. 1992. Migration of smooth muscle and endothelial cells. Critical events in restenosis. *Circulation* 86:723-729.
- Chaikof, E.L., D.C. Brewster, R.L. Dalman, M.S. Makaroun, K.A. Illig, G.A. Sicard, C.H. Timaran, G.R. Upchurch, Jr., and F.J. Veith. 2009. SVS practice guidelines for the care of patients with an abdominal aortic aneurysm: executive summary. *J Vasc Surg* 50:880-896.
- Chan, B., G. Greenan, F. McKeon, and T. Ellenberger. 2005. Identification of a peptide fragment of DSCR1 that competitively inhibits calcineurin activity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13075-13080.
- Chase, A.J., M. Bond, M.F. Crook, and A.C. Newby. 2002. Role of nuclear factor-kappa B activation in metalloproteinase-1, -3, and -9 secretion by human macrophages in vitro and rabbit foam cells produced in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:765-771.
- Cho, Y.J., M. Abe, S.Y. Kim, and Y. Sato. 2005. Raf-1 is a binding partner of DSCR1. *Archives of biochemistry and biophysics* 439:121-128.
- Crawford, D.R., K.P. Leahy, N. Abramova, L. Lan, Y. Wang, and K.J. Davies. 1997. Hamster adapt78 mRNA is a Down syndrome critical region homologue that is inducible by oxidative stress. *Archives of biochemistry and biophysics* 342:6-12.
- Curci, J.A. 2009. Digging in the "soil" of the aorta to understand the growth of abdominal aortic aneurysms. *Vascular* 17 Suppl 1:S21-29.
- Dahlof, B. 2010. Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment. *Am J Cardiol* 105:3A-9A.
- Dai, J., S. Michineau, G. Franck, P. Desgranges, J.P. Becquemin, M. Gervais, and E. Allaire. 2011. Long term stabilization of expanding aortic aneurysms by a short course of cyclosporine A through transforming growth factor-beta induction. *PloS one* 6:e28903.
- Danilczyk, U., and J.M. Penninger. 2006. Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. *Circ Res* 98:463-471.
- Daugherty, A., M.W. Manning, and L.A. Cassis. 2000. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest* 105:1605-1612.
- Daugherty, A., and L.A. Cassis. 2004. Mouse models of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:429-434.
- Davies, K.J., G. Ermak, B.A. Rothermel, M. Pritchard, J. Heitman, J. Ahnn, F. Henrique-Silva, D. Crawford, S. Canaider, P. Strippoli, P. Carinci, K.T. Min, D.S. Fox, K.W. Cunningham, R. Bassel-Duby, E.N. Olson, Z. Zhang, R.S. Williams, H.P. Gerber, M. Perez-Riba, H. Seo, X. Cao, C.B. Klee, J.M. Redondo, L.J. Maltais, E.A. Bruford, S. Povey, J.D. Molkentin, F.D. McKeon, E.J. Duh, G.R. Crabtree, M.S. Cyert, S. de la Luna, and X. Estivill. 2007. Renaming the DSCR1/Adapt78 gene family as RCAN: regulators of calcineurin. *Faseb J* 21:3023-3028.
- de Gasparo, M., K.J. Catt, T. Inagami, J.W. Wright, and T. Unger. 2000. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52:415-472.

- Dell'Acqua, M.L., K.L. Dodge, S.J. Tavalin, and J.D. Scott. 2002. Mapping the protein phosphatase-2B anchoring site on AKAP79. Binding and inhibition of phosphatase activity are mediated by residues 315-360. *J Biol Chem* 277:48796-48802.
- Dell'Acqua, M.L., M.C. Faux, J. Thorburn, A. Thorburn, and J.D. Scott. 1998. Membrane-targeting sequences on AKAP79 bind phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate. *The EMBO journal* 17:2246-2260.
- Dierssen, M., G. Arque, J. McDonald, N. Andreu, C. Martinez-Cue, J. Florez, and C. Fillat. 2011. Behavioral characterization of a mouse model overexpressing DSCR1/RCAN1. *PloS one* 6:e17010.
- Dobrin, P.B., N. Baumgartner, S. Anidjar, G. Chejfec, and R. Mrkvicka. 1996. Inflammatory aspects of experimental aneurysms. Effect of methylprednisolone and cyclosporine. *Ann N Y Acad Sci* 800:74-88.
- Donners, M.M., I. Bot, L.J. De Windt, T.J. van Berkel, M.J. Daemen, E.A. Biessen, and S. Heeneman. 2005. Low-dose FK506 blocks collar-induced atherosclerotic plaque development and stabilizes plaques in ApoE^{-/-} mice. *Am J Transplant* 5:1204-1215.
- Eichler, G.S., S. Huang, and D.E. Ingber. 2003. Gene Expression Dynamics Inspector (GEDI): forintegrative analysis of expression profiles. *Bioinformatics* 19:2321-2322.
- Emori, T., Y. Hirata, K. Ohta, M. Shichiri, and F. Marumo. 1989. Secretory mechanism of immunoreactive endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 160:93-100.
- Ermak, G., C.D. Harris, and K.J. Davies. 2002. The DSCR1 (Adapt78) isoform 1 protein calcipressin 1 inhibits calcineurin and protects against acute calcium-mediated stress damage, including transient oxidative stress. *Faseb J* 16:814-824.
- Ermak, G., T.E. Morgan, and K.J. Davies. 2001. Chronic overexpression of the calcineurin inhibitory gene DSCR1 (Adapt78) is associated with Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 276:38787-38794.
- Espinosa, A.V., M. Shinohara, L.M. Porchia, Y.J. Chung, S. McCarty, M. Saji, and M.D. Ringel. 2009. Regulator of calcineurin 1 modulates cancer cell migration in vitro. *Clinical & experimental metastasis* 26:517-526.
- Faux, M.C., E.N. Rollins, A.S. Edwards, L.K. Langeberg, A.C. Newton, and J.D. Scott. 1999. Mechanism of A-kinase-anchoring protein 79 (AKAP79) and protein kinase C interaction. *Biochem J* 343 Pt 2:443-452.
- Febbraio, M., E.A. Podrez, J.D. Smith, D.P. Hajjar, S.L. Hazen, H.F. Hoff, K. Sharma, and R.L. Silverstein. 2000. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 105:1049-1056.
- Ferrario, C.M., and W.B. Strawn. 2006. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 98:121-128.
- Ferretti, G., R.A. Rabini, T. Bacchetti, A. Vignini, E. Salvolini, F. Ravaglia, G. Curatola, and L. Mazzanti. 2002. Glycated low density lipoproteins modify platelet properties: a compositional and functional study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87:2180-2184.
- Forte, A., A. Della Corte, M. De Feo, F. Cerasuolo, and M. Cipollaro. 2010. Role of myofibroblasts in vascular remodelling: focus on restenosis and aneurysm. *Cardiovascular research* 88:395-405.

- Fuentes, J.J., L. Genesca, T.J. Kingsbury, K.W. Cunningham, M. Perez-Riba, X. Estivill, and S. de la Luna. 2000. DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. *Hum Mol Genet* 9:1681-1690.
- Fuentes, J.J., M.A. Pritchard, and X. Estivill. 1997. Genomic organization, alternative splicing, and expression patterns of the DSCR1 (Down syndrome candidate region 1) gene. *Genomics* 44:358-361.
- Fuentes, J.J., M.A. Pritchard, A.M. Planas, A. Bosch, I. Ferrer, and X. Estivill. 1995. A new human gene from the Down syndrome critical region encodes a proline-rich protein highly expressed in fetal brain and heart. *Hum Mol Genet* 4:1935-1944.
- Geisterfer, A.A., M.J. Peach, and G.K. Owens. 1988. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 62:749-756.
- Genesca, L., A. Aubareda, J.J. Fuentes, X. Estivill, S. De La Luna, and M. Perez-Riba. 2003. Phosphorylation of calcipressin 1 increases its ability to inhibit calcineurin and decreases calcipressin half-life. *Biochem J* 374:567-575.
- Getz, G.S., and C.A. Reardon. 2012. Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:1104-1115.
- Goetze, S., X.P. Xi, Y. Kawano, H. Kawano, E. Fleck, W.A. Hsueh, and R.E. Law. 1999. TNF-alpha-induced migration of vascular smooth muscle cells is MAPK dependent. *Hypertension* 33:183-189.
- Goldacre, M.J., C.J. Wotton, V. Seagroatt, and D. Yeates. 2004. Cancers and immune related diseases associated with Down's syndrome: a record linkage study. *Arch Dis Child* 89:1014-1017.
- Gordon, S., and P.R. Taylor. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5:953-964.
- Gorlach, J., D.S. Fox, N.S. Cutler, G.M. Cox, J.R. Perfect, and J. Heitman. 2000. Identification and characterization of a highly conserved calcineurin binding protein, CBP1/calcipressin, in *Cryptococcus neoformans*. *The EMBO journal* 19:3618-3629.
- Graef, I.A., F. Chen, L. Chen, A. Kuo, and G.R. Crabtree. 2001. Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell* 105:863-875.
- Graef, I.A., F. Wang, F. Charron, L. Chen, J. Neilson, M. Tessier-Lavigne, and G.R. Crabtree. 2003. Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. *Cell* 113:657-670.
- Gavrila, D., W.G. Li, M.L. McCormick, M. Thomas, A. Daugherty, L.A. Cassis, F.J. Miller, Jr., L.W. Oberley, K.C. Dellsperger, and N.L. Weintraub. 2005. Vitamin E inhibits abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II-infused apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1671-1677.
- Greaves, D.R., and S. Gordon. 2009. The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. *J Lipid Res* 50 Suppl:S282-286.
- Greene, E.L., G. Lu, D. Zhang, and B.M. Egan. 2001. Signaling events mediating the additive effects of oleic acid and angiotensin II on vascular smooth muscle cell migration. *Hypertension* 37:308-312.
- Guo, D.C., C.L. Papke, R. He, and D.M. Milewicz. 2006. Pathogenesis of thoracic and abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci* 1085:339-352.

- Guo, J., H. Chen, J. Ho, J. Mancini, T. Sontag, S.A. Laporte, D.E. Richard, and J.J. Lebrun. 2009. TGFbeta-induced GRK2 expression attenuates AngII-regulated vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Cellular signalling* 21:899-905.
- Hansson, G.K., and A. Hermansson. 2011. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 12:204-212.
- Hansson, G.K., and P. Libby. 2006. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 6:508-519.
- Harris, C.D., G. Ermak, and K.J. Davies. 2005. Multiple roles of the DSCR1 (Adapt78 or RCAN1) gene and its protein product calcipressin 1 (or RCAN1) in disease. *Cell Mol Life Sci* 62:2477-2486.
- Heeneman, S., J.C. Sluimer, and M.J. Daemen. 2007. Angiotensin-converting enzyme and vascular remodeling. *Circ Res* 101:441-454.
- Heit, J.J., A.A. Apelqvist, X. Gu, M.M. Winslow, J.R. Neilson, G.R. Crabtree, and S.K. Kim. 2006. Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta-cell growth and function. *Nature* 443:345-349.
- Hellenthal, F.A., W.A. Buurman, W.K. Wodzig, and G.W. Schurink. 2009. Biomarkers of AAA progression. Part 1: extracellular matrix degeneration. *Nat Rev Cardiol* 6:464-474.
- Hilioti, Z., and K.W. Cunningham. 2003. The RCN family of calcineurin regulators. *Biochem Biophys Res Commun* 311:1089-1093.
- Hilioti, Z., D.A. Gallagher, S.T. Low-Nam, P. Ramaswamy, P. Gajer, T.J. Kingsbury, C.J. Birchwood, A. Levchenko, and K.W. Cunningham. 2004. GSK-3 kinases enhance calcineurin signaling by phosphorylation of RCNs. *Genes Dev* 18:35-47.
- Hill, J.A., B. Rothermel, K.D. Yoo, B. Cabuay, E. Demetroulis, R.M. Weiss, W. Kutschke, R. Bassel-Duby, and R.S. Williams. 2002. Targeted inhibition of calcineurin in pressure-overload cardiac hypertrophy. Preservation of systolic function. *J Biol Chem* 277:10251-10255.
- Hoeffler, C.A., A. Dey, N. Sachan, H. Wong, R.J. Patterson, J.M. Shelton, J.A. Richardson, E. Klann, and B.A. Rothermel. 2007. The Down syndrome critical region protein RCAN1 regulates long-term potentiation and memory via inhibition of phosphatase signaling. *J Neurosci* 27:13161-13172.
- Hogan, P.G., L. Chen, J. Nardone, and A. Rao. 2003. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17:2205-2232.
- Hunyady, L., and K.J. Catt. 2006. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 20:953-970.
- Iakovou, I., T. Schmidt, E. Bonizzoni, L. Ge, G.M. Sangiorgi, G. Stankovic, F. Airoldi, A. Chieffo, M. Montorfano, M. Carlino, I. Michev, N. Corvaja, C. Briguori, U. Gerckens, E. Grube, and A. Colombo. 2005a. Incidence, predictors, and outcome of thrombosis after successful implantation of drug-eluting stents. *Jama* 293:2126-2130.
- Iakovou, I., T. Schmidt, L. Ge, G.M. Sangiorgi, G. Stankovic, F. Airoldi, A. Chieffo, M. Montorfano, M. Carlino, I. Michev, N. Corvaja, J. Cosgrave, U. Gerckens, E. Grube, and A. Colombo. 2005b. Angiographic patterns of restenosis after paclitaxel-eluting stent implantation. *J Am Coll Cardiol* 45:805-806.

- Iizuka, M., M. Abe, K. Shiiba, I. Sasaki, and Y. Sato. 2004. Down syndrome candidate region 1, a downstream target of VEGF, participates in endothelial cell migration and angiogenesis. *Journal of vascular research* 41:334-344.
- Iniguez, M.A., A. Rodriguez, O.V. Volpert, M. Fresno, and J.M. Redondo. 2003. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends in molecular medicine* 9:73-78.
- Ito, M., M.I. Oliverio, P.J. Mannon, C.F. Best, N. Maeda, O. Smithies, and T.M. Coffman. 1995. Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3521-3525.
- Itoh, H., R.E. Pratt, and V.J. Dzau. 1990. Atrial natriuretic polypeptide inhibits hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 86:1690-1697.
- Jain, J., Z. Miner, and A. Rao. 1993. Analysis of the preexisting and nuclear forms of nuclear factor of activated T cells. *J Immunol* 151:837-848.
- Ji, Y., J. Liu, Z. Wang, and N. Liu. 2009. Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway. *Journal of Cellular Biochemistry* 112:100-108.
- Johnston, K.W., R.B. Rutherford, M.D. Tilson, D.M. Shah, L. Hollier, and J.C. Stanley. 1991. Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery. *J Vasc Surg* 13:452-458.
- Junkins, R.D., A.J. MacNeil, Z. Wu, C. McCormick, and T.J. Lin. 2013. Regulator of calcineurin 1 suppresses inflammation during respiratory tract infections. *J Immunol* 190:5178-5186.
- Kadl, A., A.K. Meher, P.R. Sharma, M.Y. Lee, A.C. Doran, S.R. Johnstone, M.R. Elliott, F. Gruber, J. Han, W. Chen, T. Kensler, K.S. Ravichandran, B.E. Isakson, B.R. Wamhoff, and N. Leitinger. 2010. Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ Res* 107:737-746.
- Khallou-Laschet, J., A. Varthaman, G. Fornasa, C. Compain, A.T. Gaston, M. Clement, M. Dussiot, O. Levillain, S. Graff-Dubois, A. Nicoletti, and G. Caligiuri. 2010. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS one* 5:e8852.
- Kiani, A., A. Rao, and J. Aramburu. 2000. Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT. *Immunity* 12:359-372.
- Kingsbury, T.J., and K.W. Cunningham. 2000. A conserved family of calcineurin regulators. *Genes Dev* 14:1595-1604.
- Klauck, T.M., M.C. Faux, K. Labudda, L.K. Langeberg, S. Jaken, and J.D. Scott. 1996. Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein. *Science* 271:1589-1592.
- Kockx, M., W. Jessup, and L. Kritharides. 2010. Cyclosporin A and atherosclerosis--cellular pathways in atherogenesis. *Pharmacol Ther* 128:106-118.

- Koibuchi, Y., W.S. Lee, G.H. Gibbons, and R.E. Pratt. 1993. Role of transforming growth factor-beta 1 in the cellular growth response to angiotensin II. *Hypertension* 21:1046-1050.
- Kuriyama, M., M. Matsushita, A. Tateishi, A. Moriwaki, K. Tomizawa, K. Ishino, S. Sano, and H. Matsui. 2006. A cell-permeable NFAT inhibitor peptide prevents pressure-overload cardiac hypertrophy. *Chem Biol Drug Des* 67:238-243.
- Ladner, C.J., J. Czech, J. Maurice, S.A. Lorens, and J.M. Lee. 1996. Reduction of calcineurin enzymatic activity in Alzheimer's disease: correlation with neuropathologic changes. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:924-931.
- Lee, E.J., S.R. Seo, J.W. Um, J. Park, Y. Oh, and K.C. Chung. 2008. NF-kappaB-inducing kinase phosphorylates and blocks the degradation of Down syndrome candidate region 1. *J Biol Chem* 283:3392-3400.
- Lee, M.Y., S.M. Garvey, A.S. Baras, J.A. Lemmon, M.F. Gomez, P.D. Schoppee Bortz, G. Daum, R.C. LeBoeuf, and B.R. Wamhoff. 2010. Integrative genomics identifies DSCR1 (RCAN1) as a novel NFAT-dependent mediator of phenotypic modulation in vascular smooth muscle cells. *Hum Mol Genet* 19:468-479.
- Li, F., C. Zhang, S. Schaefer, A. Estes, and K.U. Malik. 2005. ANG II-induced neointimal growth is mediated via cPLA2- and PLD2-activated Akt in balloon-injured rat carotid artery. *American journal of physiology* 289:H2592-2601.
- Libby, P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420:868-874.
- Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson. 2011. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473:317-325.
- Liu, J., J.D. Farmer, Jr., W.S. Lane, J. Friedman, I. Weissman, and S.L. Schreiber. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66:807-815.
- Liu, J., E.S. Masuda, L. Tsuruta, N. Arai, and K. Arai. 1999. Two independent calcineurin-binding regions in the N-terminal domain of murine NF-ATx1 recruit calcineurin to murine NF-ATx1. *J Immunol* 162:4755-4761.
- Liu, J.O. 2003. Endogenous protein inhibitors of calcineurin. *Biochem Biophys Res Commun* 311:1103-1109.
- Liu, Q., J.C. Busby, and J.D. Molkentin. 2009. Interaction between TAK1-TAB1-TAB2 and RCAN1-calcineurin defines a signalling nodal control point. *Nature cell biology* 11:154-161.
- Liu, Y., D. Li, J. Chen, J. Xie, S. Bandyopadhyay, D. Zhang, A.R. Nemarkommula, H. Liu, J.L. Mehta, and P.L. Hermonat. 2006. Inhibition of atherogenesis in LDLR knockout mice by systemic delivery of adeno-associated virus type 2-hIL-10. *Atherosclerosis* 188:19-27.
- Liu, Z., C. Zhang, N. Dronadula, Q. Li, and G.N. Rao. 2005. Blockade of nuclear factor of activated T cells activation signaling suppresses balloon injury-induced neointima formation in a rat carotid artery model. *J Biol Chem* 280:14700-14708.
- Louis, S.F., and P. Zahradka. 2010. Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion. *Exp Clin Cardiol* 15:e75-85.
- Lloyd-Jones, D.M. 2010. Cardiovascular risk prediction: basic concepts, current status, and future directions. *Circulation* 121:1768-1777.

- Macian, F. 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 5:472-484.
- Maiellaro, K., and W.R. Taylor. 2007. The role of the adventitia in vascular inflammation. *Cardiovascular research* 75:640-648.
- Mallat, Z., S. Besnard, M. Duriez, V. Deleuze, F. Emmanuel, M.F. Bureau, F. Soubrier, B. Esposito, H. Duez, C. Fievet, B. Staels, N. Duverger, D. Scherman, and A. Tedgui. 1999. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res* 85:e17-24.
- Marrero, M.B., B. Schieffer, W.G. Paxton, L. Heerdt, B.C. Berk, P. Delafontaine, and K.E. Bernstein. 1995. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* 375:247-250.
- Martinez-Martinez, S., L. Genesca, A. Rodriguez, A. Raya, E. Salichs, F. Were, M.D. Lopez-Maderuelo, J.M. Redondo, and S. de la Luna. 2009. The RCAN carboxyl end mediates calcineurin docking-dependent inhibition via a site that dictates binding to substrates and regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:6117-6122.
- Martinez-Martinez, S., and J.M. Redondo. 2004. Inhibitors of the calcineurin/NFAT pathway. *Current medicinal chemistry* 11:997-1007.
- Martinez-Martinez, S., A. Rodriguez, M.D. Lopez-Maderuelo, I. Ortega-Perez, J. Vazquez, and J.M. Redondo. 2006. Blockade of NFAT activation by the second calcineurin binding site. *J Biol Chem* 281:6227-6235.
- Martin-McNulty, B., J. Vincelette, R. Vergona, M.E. Sullivan, and Y.X. Wang. 2005. Noninvasive measurement of abdominal aortic aneurysms in intact mice by a high-frequency ultrasound imaging system. *Ultrasound Med Biol* 31:745-749.
- Marx, S.O., and A.R. Marks. 2001. Bench to bedside: the development of rapamycin and its application to stent restenosis. *Circulation* 104:852-855.
- Matsubara, H. 1998. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res* 83:1182-1191.
- Matsuda, S., F. Shibasaki, K. Takehana, H. Mori, E. Nishida, and S. Koyasu. 2000. Two distinct action mechanisms of immunophilin-ligand complexes for the blockade of T-cell activation. *EMBO Rep* 1:428-434.
- Mehta, S., H. Li, P.G. Hogan, and K.W. Cunningham. 2009. Domain architecture of the regulators of calcineurin (RCANs) and identification of a divergent RCAN in yeast. *Mol Cell Biol* 29:2777-2793.
- Mestas, J., and K. Ley. 2008. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 18:228-232.
- Minami, T. 2014. Calcineurin-NFAT activation and DSCR-1 auto-inhibitory loop: how is homeostasis regulated? *J Biochem* 155:217-226.
- Minami, T., K. Horiuchi, M. Miura, M.R. Abid, W. Takabe, N. Noguchi, T. Kohro, X. Ge, H. Aburatani, T. Hamakubo, T. Kodama, and W.C. Aird. 2004. Vascular endothelial growth factor- and thrombin-induced termination factor, Down syndrome critical region-1, attenuates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *J Biol Chem* 279:50537-50554.
- Minami, T., K. Yano, M. Miura, M. Kobayashi, J. Suehiro, P.C. Reid, T. Hamakubo, S. Ryeom, W.C. Aird, and T. Kodama. 2009. The Down syndrome critical region gene 1 short variant promoters direct vascular bed-specific gene expression during inflammation in mice. *J Clin Invest* 119:2257-2270.

- Mintz, G.S., J.J. Popma, A.D. Pichard, K.M. Kent, L.F. Satler, C. Wong, M.K. Hong, J.A. Kovach, and M.B. Leon. 1996. Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 94:35-43.
- Molkentin, J.D., J.R. Lu, C.L. Antos, B. Markham, J. Richardson, J. Robbins, S.R. Grant, and E.N. Olson. 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93:215-228.
- Montezano, A.C., A. Nguyen Dinh Cat, F.J. Rios, and R.M. Touyz. 2014. Angiotensin II and Vascular Injury. *Curr Hypertens Rep* 16:431.
- Mosser, D.M., and J.P. Edwards. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8:958-969.
- Mulero, M.C., A. Aubareda, M. Orzaez, J. Messeguer, E. Serrano-Candelas, S. Martinez-Hoyer, A. Messeguer, E. Perez-Paya, and M. Perez-Riba. 2009. Inhibiting the calcineurin-NFAT (nuclear factor of activated T cells) signaling pathway with a regulator of calcineurin-derived peptide without affecting general calcineurin phosphatase activity. *J Biol Chem* 284:9394-9401.
- Mulero, M.C., A. Aubareda, A. Schluter, and M. Perez-Riba. 2007. RCAN3, a novel calcineurin inhibitor that down-regulates NFAT-dependent cytokine gene expression. *Biochimica et biophysica acta* 1773:330-341.
- Mulvany, M.J. 1998. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on vascular remodeling of resistance vessels in hypertensive patients. *Metabolism* 47:20-23.
- Naftilan, A.J., R.E. Pratt, and V.J. Dzau. 1989. Induction of platelet-derived growth factor A-chain and c-myc gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83:1419-1424.
- Nagata, D., R. Takeda, M. Sata, H. Satonaka, E. Suzuki, T. Nagano, and Y. Hirata. 2004. AMP-activated protein kinase inhibits angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 110:444-451.
- Nahmias, C., and A.D. Strosberg. 1995. The angiotensin AT2 receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function. *Trends Pharmacol Sci* 16:223-225.
- Nakashima, Y., A.S. Plump, E.W. Raines, J.L. Breslow, and R. Ross. 1994. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14:133-140.
- Nigro, P., K. Satoh, M.R. O'Dell, N.N. Soe, Z. Cui, A. Mohan, J. Abe, J.D. Alexis, J.D. Sparks, and B.C. Berk. 2010. Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* 208:53-66.
- Okamura, H., J. Aramburu, C. Garcia-Rodriguez, J.P. Viola, A. Raghavan, M. Tahirian, X. Zhang, J. Qin, P.G. Hogan, and A. Rao. 2000. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell* 6:539-550.
- Owens, G.K. 1989. Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 257:H1755-1765.
- Owens, G.K. 1995. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 75:487-517.

- Park, S., M. Uesugi, and G.L. Verdine. 2000. A second calcineurin binding site on the NFAT regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7130-7135.
- Park, J., Y. Oh, and K.C. Chung. 2009. Two key genes closely implicated with the neuropathological characteristics in Down syndrome: DYRK1A and RCAN1. *BMB reports* 42:6-15.
- Pasterkamp, G., D.P. de Kleijn, and C. Borst. 2000. Arterial remodeling in atherosclerosis, restenosis and after alteration of blood flow: potential mechanisms and clinical implications. *Cardiovascular research* 45:843-852.
- Pasterkamp, G., Z.S. Galis, and D.P. de Kleijn. 2004. Expansive arterial remodeling: location, location, location. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:650-657.
- Patel, M.I., P. Ghosh, J. Melrose, and M. Appleberg. 1996. Smooth muscle cell migration and proliferation is enhanced in abdominal aortic aneurysms. *Aust N Z J Surg* 66:305-308.
- Plump, A.S., J.D. Smith, T. Hayek, K. Aalto-Setälä, A. Walsh, J.G. Verstuyft, E.M. Rubin, and J.L. Breslow. 1992. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71:343-353.
- Podrez, E.A., M. Febbraio, N. Sheibani, D. Schmitt, R.L. Silverstein, D.P. Hajjar, P.A. Cohen, W.A. Frazier, H.F. Hoff, and S.L. Hazen. 2000. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest* 105:1095-1108.
- Porrello, E.R., L.M. Delbridge, and W.G. Thomas. 2009. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14:958-972.
- Porta, S., S.A. Serra, M. Huch, M.A. Valverde, F. Llorens, X. Estivill, M.L. Arbones, and E. Martí. 2007. RCAN1 (DSCR1) increases neuronal susceptibility to oxidative stress: a potential pathogenic process in neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 16:1039-1050.
- Qin, L., D. Zhao, X. Liu, J.A. Nagy, M.V. Hoang, L.F. Brown, H.F. Dvorak, and H. Zeng. 2006. Down syndrome candidate region 1 isoform 1 mediates angiogenesis through the calcineurin-NFAT pathway. *Mol Cancer Res* 4:811-820.
- Qin, Z. 2008. Newly developed angiotensin II-infused experimental models in vascular biology. *Regul Pept* 150:1-6.
- Randolph, G.J. 2008. Emigration of monocyte-derived cells to lymph nodes during resolution of inflammation and its failure in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 19:462-468.
- Ranger, A.M., L.C. Gerstenfeld, J. Wang, T. Kon, H. Bae, E.M. Gravallese, M.J. Glimcher, and L.H. Glimcher. 2000. The nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor NFATp (NFATc2) is a repressor of chondrogenesis. *J Exp Med* 191:9-22.
- Rao, A., C. Luo, and P.G. Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15:707-747.
- Reeves, R.H., N.G. Irving, T.H. Moran, A. Wohn, C. Kitt, S.S. Sisodia, C. Schmidt, R.T. Bronson, and M.T. Davisson. 1995. A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat Genet* 11:177-184.
- Reichman, W., C. Dyke, H.M. Lee, J. Hanrahan, S. Szentpetery, and M. Sobel. 1990. Symptomatic abdominal aortic aneurysms in long-term survivors of cardiac transplantation. *J Vasc Surg* 11:476-479.

- Ridley, A.J., M.A. Schwartz, K. Burridge, R.A. Firtel, M.H. Ginsberg, G. Borisy, J.T. Parsons, and A.R. Horwitz. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302:1704-1709.
- Robbins, C.S., I. Hilgendorf, G.F. Weber, I. Theurl, Y. Iwamoto, J.L. Figueiredo, R. Gorbato, G.K. Sukhova, L.M. Gerhardt, D. Smyth, C.C. Zavitz, E.A. Shikatani, M. Parsons, N. van Rooijen, H.Y. Lin, M. Husain, P. Libby, M. Nahrendorf, R. Weissleder, and F.K. Swirski. 2013. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med* 19:1166-1172.
- Rodriguez, A., J. Roy, S. Martinez-Martinez, M.D. Lopez-Maderuelo, P. Nino-Moreno, L. Orti, D. Pantoja-Uceda, A. Pineda-Lucena, M.S. Cyert, and J.M. Redondo. 2009. A conserved docking surface on calcineurin mediates interaction with substrates and immunosuppressants. *Mol Cell* 33:616-626.
- Roque, M., J.T. Fallon, J.J. Badimon, W.X. Zhang, M.B. Taubman, and E.D. Reis. 2000. Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:335-342.
- Ross, R. 1999. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 138:S419-420.
- Rothermel, B., R.B. Vega, J. Yang, H. Wu, R. Bassel-Duby, and R.S. Williams. 2000. A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *J Biol Chem* 275:8719-8725.
- Rothermel, B.A., T.A. McKinsey, R.B. Vega, R.L. Nicol, P. Mammen, J. Yang, C.L. Antos, J.M. Shelton, R. Bassel-Duby, E.N. Olson, and R.S. Williams. 2001. Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3328-3333.
- Ruiz-Ortega, M., O. Lorenzo, Y. Suzuki, M. Ruperez, and J. Egidio. 2001. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10:321-329.
- Ryeom, S., K.H. Baek, M.J. Rioth, R.C. Lynch, A. Zaslavsky, A. Birsner, S.S. Yoon, and F. McKeon. 2008. Targeted deletion of the calcineurin inhibitor DSCR1 suppresses tumor growth. *Cancer cell* 13:420-431.
- Ryeom, S., R.J. Greenwald, A.H. Sharpe, and F. McKeon. 2003. The threshold pattern of calcineurin-dependent gene expression is altered by loss of the endogenous inhibitor calcipressin. *Nat Immunol* 4:874-881.
- Sakalihasan, N., R. Limet, and O.D. Defawe. 2005. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet* 365:1577-1589.
- Sanchez, S.A., M.A. Tricerri, and E. Gratton. 2007. Laurdan generalized polarization fluctuations measures membrane packing micro-heterogeneity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:7314-7319.
- Sanchez, S.A., M.A. Tricerri, G. Ossato, and E. Gratton. 2010. Lipid packing determines protein-membrane interactions: challenges for apolipoprotein A-I and high density lipoproteins. *Biochimica et biophysica acta* 1798:1399-1408.
- Sanna, B., E.B. Brandt, R.A. Kaiser, P. Pfluger, S.A. Witt, T.R. Kimball, E. van Rooij, L.J. De Windt, M.E. Rothenberg, M.H. Tschoop, S.C. Benoit, and J.D. Molkentin. 2006. Modulatory calcineurin-interacting proteins 1 and 2 function as calcineurin facilitators in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7327-7332.

- Sartore, S., A. Chiavegato, E. Faggin, R. Franch, M. Puato, S. Ausoni, and P. Pauletto. 2001. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ Res* 89:1111-1121.
- Sartore, S., R. Franch, M. Roelofs, and A. Chiavegato. 1999. Molecular and cellular phenotypes and their regulation in smooth muscle. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 134:235-320.
- Satoh, K., P. Nigro, T. Matoba, M.R. O'Dell, Z. Cui, X. Shi, A. Mohan, C. Yan, J. Abe, K.A. Illig, and B.C. Berk. 2009. Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms. *Nat Med* 15:649-656.
- Satonaka, H., E. Suzuki, H. Nishimatsu, S. Oba, R. Takeda, A. Goto, M. Omata, T. Fujita, R. Nagai, and Y. Hirata. 2004. Calcineurin promotes the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in vascular myocytes and mediates vascular inflammation. *Circ Res* 94:693-700.
- Sayeski, P.P., and M.S. Ali. 2003. The critical role of c-Src and the Shc/Grb2/ERK2 signaling pathway in angiotensin II-dependent VSMC proliferation. *Exp Cell Res* 287:339-349.
- Schaper, W., and W.D. Ito. 1996. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circulation research* 79:911-919.
- Schulman, I.H., and L. Raij. 2008. The angiotensin II type 2 receptor: what is its clinical significance? *Curr Hypertens Rep* 10:188-193.
- Schwartz, S.M. 1997. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest* 100:S87-89.
- Schwartz, S.M., D. deBlois, and E.R. O'Brien. 1995. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 77:445-465.
- Scott-Burden, T., T.J. Resink, A.W. Hahn, and P.M. Vanhoutte. 1991. Induction of endothelin secretion by angiotensin II: effects on growth and synthetic activity of vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 17 Suppl 7:S96-100.
- Shi, Y., J.E. O'Brien, A. Fard, J.D. Mannion, D. Wang, and A. Zalewski. 1996. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation* 94:1655-1664.
- Shimizu, K., P. Libby, and R.N. Mitchell. 2005. Local cytokine environments drive aneurysm formation in allografted aortas. *Trends Cardiovasc Med* 15:142-148.
- Shin, S.Y., H.W. Yang, J.R. Kim, W. Do Heo, and K.H. Cho. 2011. A hidden incoherent switch regulates RCAN1 in the calcineurin-NFAT signaling network. *Journal of cell science* 124:82-90.
- Smyth, G.K. 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. appl. Genet. Mol. Biol.* 3:e3.
- Stary, H.C., A.B. Chandler, S. Glagov, J.R. Guyton, W. Insull, Jr., M.E. Rosenfeld, S.A. Schaffer, C.J. Schwartz, W.D. Wagner, and R.W. Wissler. 1994. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, Stossel, T.P. 1994. The machinery of cell crawling. *Sci Am* 271:54-55, 58-63.
- Strippoli, P., M. Petrini, L. Lenzi, P. Carinci, and M. Zannotti. 2000. The murine DSCR1-like (Down syndrome candidate region 1) gene family: conserved syntenic with the human orthologous genes. *Gene* 257:223-232.

- Sun, L., H.D. Youn, C. Loh, M. Stelow, W. He, and J.O. Liu. 1998. Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity* 8:703-711.
- Suzuki, E., H. Nishimatsu, H. Satonaka, K. Walsh, A. Goto, M. Omata, T. Fujita, R. Nagai, and Y. Hirata. 2002. Angiotensin II induces myocyte enhancer factor 2- and calcineurin/nuclear factor of activated T cell-dependent transcriptional activation in vascular myocytes. *Circ Res* 90:1004-1011.
- Suzuki, H., Y. Kurihara, M. Takeya, N. Kamada, M. Kataoka, K. Jishage, O. Ueda, H. Sakaguchi, T. Higashi, T. Suzuki, Y. Takashima, Y. Kawabe, O. Cynshi, Y. Wada, M. Honda, H. Kurihara, H. Aburatani, T. Doi, A. Matsumoto, S. Azuma, T. Noda, Y. Toyoda, H. Itakura, Y. Yazaki, T. Kodama, and et al. 1997. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386:292-296.
- Taniyama, Y., and K.K. Griendling. 2003. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 42:1075-1081.
- Touyz, R.M. 2005. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp Physiol* 90:449-455.
- Touyz, R.M., and E.L. Schiffrin. 2000. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 52:639-672.
- van Kleef, E.M., J. Fingerle, and M.J. Daemen. 1996. Angiotensin II-induced progression of neointimal thickening in the balloon-injured rat carotid artery is AT1 receptor mediated. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:857-863.
- van Rooij, E., P.A. Doevendans, H.J. Crijns, S. Heeneman, D.J. Lips, M. van Bilsen, R.S. Williams, E.N. Olson, R. Bassel-Duby, B.A. Rothermel, and L.J. De Windt. 2004. MCIP1 overexpression suppresses left ventricular remodeling and sustains cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res* 94:e18-26.
- van Tits, L.J., R. Stienstra, P.L. van Lent, M.G. Netea, L.A. Joosten, and A.F. Stalenhoef. 2011. Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: a crucial role for Kruppel-like factor 2. *Atherosclerosis* 214:345-349.
- Vega, R.B., R. Bassel-Duby, and E.N. Olson. 2003a. Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling. *J Biol Chem* 278:36981-36984.
- Vega, R.B., B.A. Rothermel, C.J. Weinheimer, A. Kovacs, R.H. Naseem, R. Bassel-Duby, R.S. Williams, and E.N. Olson. 2003b. Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:669-674.
- Vega, R.B., J. Yang, B.A. Rothermel, R. Bassel-Duby, and R.S. Williams. 2002. Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of calcineurin activity. *J Biol Chem* 277:30401-30407.
- Waldo, S.W., Y. Li, C. Buono, B. Zhao, E.M. Billings, J. Chang, and H.S. Kruth. 2008. Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 172:1112-1126.
- Wang, Y., G.W. De Keulenaer, E.O. Weinberg, S. Muangman, A. Gualberto, K.T. Landschulz, T.G. Turi, J.F. Thompson, and R.T. Lee. 2002. Direct biomechanical induction of endogenous calcineurin inhibitor Down Syndrome Critical Region-1 in cardiac myocytes. *American journal of physiology* 283:H533-539.

- Ward, M.R., G. Pasterkamp, A.C. Yeung, and C. Borst. 2000. Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation* 102:1186-1191.
- Watanabe, T., R. Pakala, T. Katagiri, and C.R. Benedict. 2001. Serotonin potentiates angiotensin II--induced vascular smooth muscle cell proliferation. *Atherosclerosis* 159:269-279.
- Weintraub, N.L. 2009. Understanding abdominal aortic aneurysm. *N Engl J Med* 361:1114-1116.
- Welt, F.G., and C. Rogers. 2002. Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1769-1776.
- Wilcox, J.N., R. Waksman, S.B. King, and N.A. Scott. 1996. The role of the adventitia in the arterial response to angioplasty: the effect of intravascular radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 36:789-796.
- Wolf, C., W.J. Cai, R. Vosschulte, S. Koltai, D. Mousavipour, D. Scholz, A. Afsah-Hedjri, W. Schaper, and J. Schaper. 1998. Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries. *J Mol Cell Cardiol* 30:2291-2305.
- Woollard, K.J., and F. Geissmann. 2010. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol* 7:77-86.
- Wu, H., S.C. Kao, T. Barrientos, S.H. Baldwin, E.N. Olson, G.R. Crabtree, B. Zhou, and C.P. Chang. 2007. Down syndrome critical region-1 is a transcriptional target of nuclear factor of activated T cells-c1 within the endocardium during heart development. *J Biol Chem* 282:30673-30679.
- Yamaguchi, T., M. Yokokawa, M. Suzuki, S. Higashide, Y. Katoh, S. Sugiyama, and T. Misaki. 2000. The effect of immunosuppression on aortic dilatation in a rat aneurysm model. *Surg Today* 30:1093-1099.
- Yamakawa, T., S. Tanaka, K. Numaguchi, Y. Yamakawa, E.D. Motley, S. Ichihara, and T. Inagami. 2000. Involvement of Rho-kinase in angiotensin II-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 35:313-318.
- Yang, J., B. Rothermel, R.B. Vega, N. Frey, T.A. McKinsey, E.N. Olson, R. Bassel-Duby, and R.S. Williams. 2000. Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res* 87:E61-68.
- Yang, Y.J., W. Chen, A. Edgar, B. Li, J.D. Molkentin, J.N. Berman, and T.J. Lin. 2009. Rcan1 negatively regulates Fc epsilonRI-mediated signaling and mast cell function. *J Exp Med* 206:195-207.
- Yang, Y.J., A.J. Macneil, R. Junkins, S.O. Carrigan, J.T. Tang, N. Forward, D. Hoskin, J.N. Berman, and T.J. Lin. 2011. Regulator of calcineurin 1 (rcan1) is required for the development of pulmonary eosinophilia in allergic inflammation in mice. *Am J Pathol* 179:1199-1210.
- Yao, Y.G., and E.J. Duh. 2004. VEGF selectively induces Down syndrome critical region 1 gene expression in endothelial cells: a mechanism for feedback regulation of angiogenesis? *Biochem Biophys Res Commun* 321:648-656.
- Yoshioka, T., T. Okada, Y. Maeda, U. Ikeda, M. Shimpō, T. Nomoto, K. Takeuchi, M. Nonaka-Sarukawa, T. Ito, M. Takahashi, T. Matsushita, H. Mizukami, Y. Hanazono, A. Kume, S. Ookawara, M. Kawano, S. Ishibashi, K. Shimada, and K. Ozawa. 2004. Adeno-associated virus vector-mediated interleukin-10 gene

- transfer inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Gene Ther* 11:1772-1779.
- Yu, H., K. Sliedregt-Bol, H. Overkleeft, G.A. van der Marel, T.J. van Berkel, and E.A. Biessen. 2006. Therapeutic potential of a synthetic peptide inhibitor of nuclear factor of activated T cells as antirestenotic agent. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1531-1537.
- Zhang, S.H., R.L. Reddick, J.A. Piedrahita, and N. Maeda. 1992. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258:468-471.

A microscopic image of tissue, likely a histological section, showing a complex arrangement of cells and fibers. The tissue is stained with a combination of red and blue dyes, highlighting various cellular components and structural features. The red staining is prominent in the lower right quadrant, while the blue staining is more widespread, particularly in the upper left and central areas. The overall appearance is that of a dense, organized tissue structure.

ANEXO I

